

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-308490
(P2000-308490A)

(43)公開日 平成12年11月7日(2000.11.7)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 有 -請求項の数20 O L (全 95 頁)

(21)出願番号 特願平11-267847
 (62)分割の表示 特願平9-520744の分割
 (22)出願日 平成8年12月2日(1996.12.2)

(31)優先権主張番号 08/564,955
 (32)優先日 平成7年11月30日(1995.11.30)
 (33)優先権主張国 米国 (U S)
 (31)優先権主張番号 08/621,859
 (32)優先日 平成8年3月25日(1996.3.25)
 (33)優先権主張国 米国 (U S)

(71)出願人 599133761
 マキシジェン, インコーポレイテッド
 MAXYGEN, INC.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 95051,
 サンタ クララ, セントラル エクスプ
 レスウェイ 3410
 (72)発明者 ウィレム ビー. シー. ステマー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 95030,
 ロス アルトス, キャシー コート
 108
 (74)代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 反復的選択および組換えにより所望の特徴を有するポリヌクレオチドを作製する方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 DNA、RNA、タンパク質等の高度に複雑な直線配列のインビボ、インビトロにおける直接分子進化を組換えによって可能にする変異誘発、インビボ組換え及び選択の反復サイクルの使用の提供。

【解決手段】 シャッフルされるべきポリヌクレオチドの複数改変体を選択のため複数の遺伝子をコードする工程；該ポリヌクレオチドの複数選択改変体からの配列を有する部分的にアニールされたポリヌクレオチド鎖のマルチサイクリック伸長工程で、1つの鎖が組換えポリヌクレオチドの集団を生成するように部分的にアニールされる別の鎖の伸長のためのテンプレートとして作用する条件下で該ポリヌクレオチド鎖が互いに類似領域及び異種領域を有し該類似領域を通して部分的にアニールされる工程、遺伝子又はその発現産物によって付与される所望の性質について、該複数の遺伝子をコードする組換えポリヌクレオチドのスクリーニング又は選択の工程を含む方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリヌクレオチドをシャッフルする方法であって、以下：シャッフルされるべきポリヌクレオチドの複数の改変体を選択する工程であって、該ポリヌクレオチドは複数の遺伝子をコードする、工程；該ポリヌクレオチドの複数の選択された改変体からの配列を有する部分的にアニールされたポリヌクレオチド鎖においてマルチサイクリックポリヌクレオチド伸長プロセスを行う工程であって、1つの鎖が、組換えポリヌクレオチドの集団を生成するように部分的にアニールされている別の鎖の伸長のためのテンプレートとして作用する条件下で、該ポリヌクレオチド鎖が互いに類似な領域および異種の領域を有し、そして該類似な領域を介して部分的にアニールされる、工程、
遺伝子またはその発現産物によって付与される所望の性質について、該複数の遺伝子をコードする組換えポリヌクレオチドをスクリーニングまたは選択する工程、を含む、方法。

【請求項2】 前記マルチプル遺伝子が、本質的に物理的にクラスター化される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記マルチプル遺伝子がマルチ成分経路を形成する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記マルチ成分経路における遺伝子の発現産物が二次代謝物を産生する、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記二次代謝物が抗生物質である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記改変体が天然の改変体を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記改変体が誘導された改変体を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 前記天然に存在する改変体が、複数の遺伝子の対立遺伝子改変体を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項9】 前記天然に存在する改変体が、複数の遺伝子の種改変体を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項10】 前記増幅プロセスを行う前にポリヌクレオチドの改変体の集団をランダムにフラグメント化する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項11】 前記増幅プロセスの少なくとも1つのサイクルが、ポリヌクレオチドの改変体の不完全な伸長を生じる条件下で行われる、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、所望の表現型を与えるポリヌクレオチドおよび／または選択可能であるかもしれないスクリーニングされ得る有利な予め決定された特性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドの生成方法に関する。1つの局面において、この方法は、変異タンパク質をコードする所望の核酸フラグメン

トを作製および選択またはスクリーニングするために使用される。

【0002】

【従来の技術】（関連出願の相互参照）本出願は、1996年3月25日に出願されたUSSN 08/621,859の一部継続出願であり、そして1995年11月30日に出願されたUSSN 08/564,955の一部継続出願である。

【0003】生体高分子（例えば、タンパク質、DNAなど）の活性配列の複雑さは、その情報内容（information content）（「IC」；5-9）と呼ばれている。タンパク質の情報内容は、アミノ酸配列変異に対する活性タンパク質の抵抗性として定義され、同様の機能を有する関連配列のファミリーを記載するために必要な最少数の不変アミノ酸（ビット）から算定される（9、10）。ランダムな変異誘発に感受性であるタンパク質は、高い情報内容を有する。1974年に、この定義が作製された際、タンパク質の多様性は、分類上の多様性としてしか存在していなかった。

【0004】分子ライブラリーのような分子生物学の発達は、かなり多数の変異しやすい塩基の同定、およびランダムなライブラリーからの機能配列の選択さえ可能にしてきた。大部分の残基が、典型的に全てが同時にではないにしても、変異され得、配列の前後関係（context）の変化を補うことに依存している。従って、100アミノ酸のタンパク質は、2,000個の異なる変異しか含まないが、20¹⁰⁰通りの可能な変異の組み合わせを含む。

【0005】情報密度は、配列の単位長当たりの情報内容である。酵素の活性部位は高い情報密度を有する傾向がある。対照的に、酵素における可変リンカー（flexible linker）は低い情報密度を有する（8）。

【0006】ライブラリー形式で変異タンパク質を作製するために現在広く用いられている方法は、誤りがちな（error-prone）ポリメラーゼ連鎖反応（11、12、19）およびカセット変異誘発（8、20、21、22、40、41、42）であり、これらの方法では最適化しようとする特定の領域が、合成的に変異誘発されたオリゴヌクレオチドで置換される。あるいは、宿主細胞のミューテーター株が、変異頻度を増大するために使用されてきた（GreenerおよびCallahan（1995）Strategies in Mol. Biol. 7: 32）。どちらの場合も、「変異体曇り（mutant cloud）」（4）は、元の配列における特定の部位の周囲で生成される。

【0007】誤りがちなPCRは、長い配列にわたってランダムに低レベルの点変異を導入するために、低適合性の重合条件を使用する。誤りがちなPCRは、未知の

配列のフラグメントの混合物を変異誘発するために使用され得る。しかし、コンピューターシミュレーションは、点変異誘発単独では、しばしばあまりにも緩やかで、連続した配列進化に必要とされるブロック変化が可能でない場合もあることを示唆した。公表されている誤りがちなPCRプロトコルは、一般的に、0.5 kb～1.0 kbより大きいDNAフラグメントの確実な増幅に適切ではなく、それらの実際的な適用は限られている。さらに、誤りがちなPCRの反復サイクルは、中立変異の蓄積を導き、これは例えば、タンパク質を免疫原性にし得る。

【0008】オリゴヌクレオチド指定変異誘発では、短い配列が、合成的に変異誘発されたオリゴヌクレオチドで置換される。このアプローチは、遠位変異の組み合わせを生成せず、従って有意な組み合わせではない。莫大な配列長に関する制限されたライブラリーサイズは、タンパク質の最適化のために多数回の選択が避けられないことを意味する。合成オリゴヌクレオチドを用いる変異誘発には、各回の選択の後に個々のクローンを配列決定し、次いでファミリーに分類して、単一のファミリーを任意に選択し、そしてファミリーをコンセンサスモチーフに縮小する必要がある。このコンセンサスモチーフは再合成され、そして単一の遺伝子内へ再挿入された後にさらに選択される。このプロセスは、統計的なボトルネック (statistical bottleneck) を構成し、多数回の変異誘発のために集中的に労働力を必要とし、そして実際のでない。

【0009】従って、誤りがちなPCRおよびオリゴヌクレオチド指定変異誘発は、単一サイクルの配列微調整には有用であるが、多数サイクルに適用する場合、直ちに制限されるようになる。

【0010】誤りがちなPCRは未知の配列のフラグメントの混合物を変異誘発するために使用され得る (11, 12)。しかし、公表されている誤りがちなPCRプロトコル (11, 12) は、ポリメラーゼの低いプロセスビティ (processivity) を受ける。従って、このプロトコルは、平均的なサイズの遺伝子のランダムな変異誘発のための使用には非常に困難である。このように能力がないことによって、誤りがちなPCRの実際的な適用が制限される。

【0011】誤りがちなPCRのもう1つの重大な制限は、配列の情報内容に伴って下流変異率が増すことである。特定の情報内容、ライブラリーのサイズ、および変異誘発率で、下流変異の上流変異に対するバランスは、統計的に、さらなる改善の選択を阻害する (統計的最高限度)。

【0012】最後に、誤りがちなPCRの反復サイクルはまた、例えば、免疫原性に影響し得るが、結合親和性には影響しない中立変異の蓄積を導く。

【0013】従って、誤りがちなPCRは、あまりにも

緩やかで連続した配列進化に必要とされるブロック変化が可能でないことが見出された (1, 2)。

【0014】カセット変異誘発において、単一のテンプレートの配列ブロックは、代表的に、(部分的に)ランダム化された配列により置換される。従って、得られ得る最大情報内容は、ランダムな配列の数 (すなわち、ライブラリーのサイズ) により統計学的に制限される。このことは統計的なボトルネックを構成し、現在のところ最適ではないが、より長期間のポテンシャルを有し得る他の配列ファミリーを排除する。

【0015】さらに、合成オリゴヌクレオチドでの変異誘発は、各回の選択の後に個々のクローンの配列決定を必要とする (20)。従って、このアプローチは時間がかかり、そして多数回の変異誘発には实际的でない。

【0016】従って、誤りがちなPCRおよびカセット変異が最も適しており、そして比較的低い情報内容の範囲を微調整するために広く使用されてきた。1つの例は、多数回の誤りがちなPCRによる増幅および選択を用いる、ランダムライブラリーからのRNAリガーゼリボザイムの選択である (13)。

【0017】直鎖状の生物学的組換え配列 (例えば、タンパク質、RNAおよびDNA) の設計のための本発明者らの科学的な手段は、高分子または生物の多くの所望の特性を最適化するために必要とされる、必要な配列多様性を生じるために適切ではないことが、ますます明らかになっている。より良い変異体を見出すことは、より大きなライブラリー内でより多くの配列をサーチすることに依存しており、変異誘発性の増幅および選択のサイクルの数を増加することが必要である。しかし、上記のように、広く用いられている現在の変異誘発方法には、反復サイクルのために使用される場合、明らかに制限がある。

【0018】大部分の生物の進化は自然淘汰および有性生殖により生じる。有性生殖は選択された個体の子孫の遺伝子を混合および結合することを確実にする。減数分裂の間、親由来の相同染色体を互いに並べ、そしてそれらの長さに沿って交差することによって、遺伝子物質を交換する (swap)。このようなDNAの交換またはシャッフリング (shuffling) は、生物がより迅速に進化することを可能にする (1, 2)。有性組換えにおいて、挿入された配列は同種環境内で有用性が証明された配列なので、一旦挿入された配列が新しい配列中へ挿入されても、実質的な情報内容を有するようである。

【0019】Martonら (27) は、直列的に反復配列を有するプラスミドにおける組換えをモニターするための、インビトロにおけるPCRの使用を記載している。Martonらは、DNAの切断またはニッキング (nicking) の結果として、PCRの間に組換えが生じることを開示している。これにより組換え分子が

生じる。Meyerhansら(23)もまた、インビトロにおけるPCR中にDNA組換えが存在することを開示している。

【0020】用語、適用された分子進化(「AME」)は、進化的設計アルゴリズムの特定の有用な目的に対する適用を意味する。AMEのための多くの異なるライブラリー形式が、ポリヌクレオチド(3、11-14)、ペプチドおよびタンパク質(ファージ(15-17)、*lacI*(18)およびポリソーム)について報告されてきたが、これらの形式においては、いずれも、組み合わせライブラリーを故意に作製するためのランダムな交差による組換えを使用していない。

【0021】理論的には、100アミノ酸のタンパク質には2,000通りの異なる個々の変異体が存在する。100個アミノ酸からなるタンパク質は、2¹⁰⁰通りの可能な変異の組み合わせを有するが、数が多すぎるので、従来の方法では徹底的に調査し得ない。これらの可能な組み合わせ変異(combination mutation)の全てを生成およびスクリーニングすること可能にするようなシステムを開発することは有益である。

【0022】Winterおよび共同研究者らは(43、44)は、ファージシステムでの発現のために、インビボ部位特異的組換えシステムを利用して軽鎖抗体の遺伝子と重鎖抗体の遺伝子とを結合した。しかし、彼らのシステムは組換えの特異的部位に依存しており、それゆえ制限される。Hayashiら(48)は、重複伸長およびPCRによる単鎖抗体(scFv)における抗体CDR領域の同時変異誘発を報告している。

【0023】Carenら(45)は、ランダムなインビボ組換えを使用する大規模集団の多重変異体を生成する方法を記載している。しかし、彼らの方法は、プラスミドの2つの異なるライブラリーの組み換えを必要としており、各ライブラリーは異なる選択マーカーを有している。従って、方法は、存在する選択マーカーの数に等しい限られた数の組換えに制限され、そして選択された配列に連結するマーカー遺伝子の数を同時に直線的に増加する。Carenらは、複数の選択サイクルの使用を記載していない；組換えは単に、より大きなライブラリーを構築するために使用される。

【0024】Calogeroら(46)およびGalizziら(47)は、プラスミド上の相同であるが短縮された(truncated)2つの昆虫毒素遺伝子間のインビボ組換えは、ハイブリッド遺伝子を生成し得ることを報告している。Radmanら(49)は、欠損型ミスマッチ修復酵素を有する宿主細胞において、実質的にミスマッチなDNA配列のインビボ組換えによりハイブリッド分子が形成されることを報告している。

【0025】

【発明が解決しようとする課題】変異タンパク質を生成

する方法を開発することは有益であり、本方法は容易にサーチされる変異核酸配列の大規模ライブラリーの開発を可能にした。本明細書に記載の発明は、点変異誘発、核酸シャッフリングおよび選択の反復サイクルの使用に関し、タンパク質のような高度に複雑な直線配列のインビトロにおける直接的な分子進化を、ランダム組換えによって可能にする。

【0026】それゆえに、変異DNA、RNAまたはタンパク質の大規模ライブラリーの生成を可能にする方法、および所望の目的のために特定の変異体を選択することを可能にする方法を開発することは有益である。本明細書に記載の発明は、DNA、RNAまたはタンパク質のような高度に複雑な直線配列のインビボおよびインビトロにおける直接分子進化を、組換えによって可能にする変異誘発、インビボ組換えおよび選択の反復サイクルの使用に関する。

【0027】本発明のさらなる利点については、添付の図面を参考にして、本発明の以下の記載から明らかになる。

【0028】

【課題を解決するための手段】本発明の1つの実施態様において、ポリヌクレオチドをシャッフルする方法であって、以下：シャッフルされるべきポリヌクレオチドの複数の改変体を選択する工程であって、該ポリヌクレオチドは複数の遺伝子をコードする、工程；該ポリヌクレオチドの複数の選択された改変体からの配列を有する部分的にアニールされたポリヌクレオチド鎖においてマルチサイクリックポリヌクレオチド伸長プロセスを行う工程であって、1つの鎖が、組換えポリヌクレオチドの集団を生成するように部分的にアニールされている別の鎖の伸長のためのテンプレートとして作用する条件下で、該ポリヌクレオチド鎖が互いに類似な領域および異種の領域を有し、そして該類似な領域を通して部分的にアニールされる、工程、遺伝子またはその発現産物によって付与される所望の性質について、該複数の遺伝子をコードする組換えポリヌクレオチドをスクリーニングまたは選択する工程、を包含する、方法が提供される。

【0029】本発明のさらなる実施態様において、前記マルチプル遺伝子が、本質的に物理的にクラスター化される方法が提供される。

【0030】本発明のさらなる実施態様において、前記マルチプル遺伝子がマルチ成分経路を形成する方法が提供される。

【0031】本発明のなおさらなる実施態様において、前記マルチ成分経路における遺伝子の発現産物が二次代謝物を産生する方法が提供される。

【0032】本発明のなおさらなる局面において、前記二次代謝物が抗生物質である方法が提供される。

【0033】本発明のさらなる実施態様において、前記改変体が天然の改変体を含む方法が提供される。

【0034】本発明のさらなる実施態様において、前記改変体が誘導された改変体を含む方法が提供される。

【0035】本発明のさらなる実施態様において、前記天然に存在する改変体が、前記複数の遺伝子の対立遺伝子改変体を含む方法が提供される。

【0036】本発明のさらなる実施態様において、前記天然に存在する改変体が、前記複数の遺伝子の種改変体を含む方法が提供される。

【0037】本発明のさらなる実施態様において、前記増幅プロセスを行う前にポリヌクレオチドの改変体の集団をランダムにフラグメント化する工程をさらに含む方法が提供される。

【0038】本発明のさらなる実施態様において、前記増幅プロセスの少なくとも1つのサイクルが、前記ポリヌクレオチドの改変体の不完全な伸長を生じる条件下で行われる方法が提供される。

【0039】本発明は、選択されたポリヌクレオチド配列または選択されたポリヌクレオチド配列の集団を、代表的には増幅されたポリヌクレオチドおよび／またはクローニングされたポリヌクレオチドの形態において生成する方法に関し、それによって選択されたポリヌクレオチド配列は、選択され得る所望の表現型の特徴（例えば、ポリペプチドをコードする、連結されたポリヌクレオチドの転写を促進する、タンパク質に結合するなどの特徴）を有する。所望の構造または機能的特性（例えば、予め決定された生体高分子（例えば、レセプター）への結合）を有するポリペプチドを同定する1つの方法は、ポリペプチドの大規模ライブラリーを、ポリペプチドのアミノ酸配列により与えられる所望の構造または機能的特性を有する個々のライブラリーメンバーについてスクリーニングすることを包含する。

【0040】一般的な局面において、本発明は、選択またはスクリーニングされ得る所望の特徴を有する組換えポリヌクレオチドのライブラリーを作製するための、「配列シャッフリング (shuffling)」と呼ばれる方法を提供する。組換えポリヌクレオチドのライブラリーは、実質的な配列同一性を有し、そしてインビトロまたはインビボで相同組換えされ得る配列領域を含む、関連配列ポリヌクレオチドの集団から作製される。この方法において、少なくとも2種類の関連配列ポリヌクレオチドが、配列組換えポリヌクレオチドを作製するために適切な組換えシステムにおいて結合される。ここで、上記の配列組換えポリヌクレオチドは、少なくとも1つの第1の種の関連配列ポリヌクレオチドの部分と、少なくとも1つの第2の種の関連配列ポリヌクレオチドの少なくとも1つの隣接した部分とを含む。配列組換えポリヌクレオチドを作製するために適切な組換えシステムは、以下のいずれかである：(1) 増幅または本明細書中に記載の他の形式を介する相同組換えまたは配列シャッフリングのためのインビトロシステム、あるいは

(2) 相同組換えまたは本明細書中に記載の部位特異的組換えのためのインビボシステム。配列組換えポリヌクレオチドの集団は、所望のまたは有利な特徴を有し、そして適切な選択方法またはスクリーニング方法によって選択され得るポリヌクレオチドの部分集団を含む。次いで、代表的な関連配列ポリヌクレオチドである選択された配列組換えポリヌクレオチドは、少なくとも1つの反復サイクルに供され得る。ここで、少なくとも1つの選択された配列組換えポリヌクレオチドは、少なくとも1つの別の種類の関連配列ポリヌクレオチド（それ自身が選択された配列組換えポリヌクレオチドであり得る）と、配列組換えポリヌクレオチドを作製するために適切な組換えシステムにおいて組み合わせられる。その結果、配列組換えポリヌクレオチド配列のさらなる世代は、使用される選択方法またはスクリーニング方法によって得られる選択された配列組換えポリヌクレオチドから作製される。この様式において、反復配列組換えは、所望の特徴を有する配列組換えポリヌクレオチドである、ライブラリーのメンバーを生じる。このような特徴は、任意の特性であり得るか、またはスクリーニングシステムにおいて選択され得るかもしくは検出され得る特性であり、そして以下の特性を含み得る：選択可能なまたは検出可能な特性を付与する任意の特徴のような、コードされるタンパク質、転写エレメント、配列制御性転写、RNAプロセッシング、RNA安定性、クロマチン構造、翻訳、または遺伝子もしくはトランスジーンの他の発現特性、複製エレメント、タンパク質結合エレメントなど。

【0041】本発明は、親和性相互作用スクリーニングまたは表現型スクリーニングに適切なディスプレイされたポリペプチドまたはディスプレイされた抗体のライブラリーを生成する方法を提供する。本方法は、(1) ディスプレイされたポリペプチドまたはディスプレイされた抗体、および上記のディスプレイされたポリペプチドまたはディスプレイされた抗体をコードする関連ポリヌクレオチドを含む第1の複数の選択されたライブラリーメンバーを得、そして上記の関連ポリヌクレオチドまたはそのコピーを得る工程であって、ここで上記の関連ポリヌクレオチドが実質的に同一の配列の領域を含み、必要に応じて上記のポリヌクレオチドまたはコピーに変異を導入する工程、および(2) ヌクレアーゼ消化、部分的伸長PCR増幅、PCRスタックリング (stuttering)、または他の適切なフラグメント化手段によって（代表的には、ランダムフラグメントもしくはフラグメント等価物の作製によって）、PCR増幅に適切な条件下でそのフラグメントを形成するための上記の関連ポリヌクレオチドまたはコピーを、プールおよびフラグメント化する工程、PCR増幅および必要に応じて変異誘発を行う工程、およびそれにより上記フラグメントを相同組換えして、組換えポリヌクレオチドのシャッフされたプールを形成する工程であって、それにより上

記シャッフルされたプールの組換えポリヌクレオチドの実質的画分（例えば、10%を超える）が、第1の複数の選択されたライブラリーメンバー中に存在せず、上記シャッフルされたプールは、親和性相互作用スクリーニングに適切なディスプレイされたポリペプチドまたはディスプレイされた抗体のライブラリーを構成する工程を包含する。必要に応じて本方法は、予め決定された高分子（例えば、タンパク質性レセプター、ペプチド、オリゴ糖、ビリオン、または他の予め決定された化合物もしくは構造）と結合またはさなければ相互作用する能力を有する個々のシャッフルされたライブラリーメンバー（例えば、触媒性抗体）を同定するために、シャッフルしたプールのライブラリーメンバーをスクリーニングするさらなる工程を包含する。このようなライブラリーから同定されるディスプレイされたポリペプチド、抗体、ペプチド模倣（peptidomimetic）抗体、および可変領域配列は、治療、診断、研究、および関連する目的（例えば、触媒、水性溶液の浸透性を増大させるための溶質など）のために使用され得、および/またはシャッフルおよび/または親和性選択の1回以上のさらなるサイクルを受け得る。本方法は、選択の工程が、予め決定された分子に対する結合親和性以外の表現型の特徴（例えば、触媒活性、安定性、酸化抵抗性、薬物耐性、または宿主細胞上で与えられる発出可能な表現型）を対象とするように改変され得る。

【0042】1つの実施態様において、第1の複数の選択されたライブラリーのメンバーは、フラグメント化され、そしてインビトロでのPCRによって相同組換えされる。フラグメントの作製は、本明細書中に記載されるような、ヌクレアーゼ消化、部分的伸長PCR増幅、PCRスタックリング、または他の適切なフラグメント化手段による。スタックリングは、テンプレートの不完全なポリメラーゼ伸長によるフラグメント化である。非常に短いPCR伸長回数に基づく組換え形式が、部分的なPCR産物を作製するために使用された。これは次の（および続く）サイクルにおいて別のテンプレートを伸長し続ける。

【0043】1つの実施態様において、第1の複数の選択されたライブラリーのメンバーは、インビトロにおいてフラグメント化され、得られるフラグメントを宿主細胞または生物へ移入し、そして相同組換えされて、インビボにおけるシャッフルされたライブラリーのメンバーを形成する。

【0044】1つの実施態様において、第1の複数の選択されたライブラリーのメンバーは、エピソード的に複製可能なベクター上でクローニングまたは増幅され、上記多様なベクターは細胞へ移入され、そして相同組換えされ、インビボにおけるシャッフルされたライブラリーのメンバーを形成する。

【0045】1つの実施態様において、第1の複数の選

択されたライブラリーのメンバーはフラグメント化されないが、直列反復または間接（もしくは逆方向）反復としてエピソード的に複製可能なベクター上でクローニングまたは増幅され、各反復は、選択されたライブラリーのメンバー配列の異なる種を含み、上記ベクターは細胞内へ移入され、そしてベクター内またはベクター間の組換えにより相同組換えされて、インビボにおけるシャッフルされたライブラリーのメンバーを形成する。

【0046】1つの実施態様において、インビトロおよびインビボでのシャッフルの組み合わせが、組み合わせの多様性を増強するために提供される。

【0047】本発明は、親和性相互作用スクリーニングに適切なディスプレイされた抗体のライブラリーを生成する方法を提供する。この方法は、（1）ディスプレイされた抗体、および上記のディスプレイされた抗体をコードする関連ポリヌクレオチドを含む、第1の複数の選択されるライブラリーメンバーを得る工程、および上記の関連ポリヌクレオチドまたはそのコピーを得る工程であって、ここで上記の関連ポリヌクレオチドが、実質的に同一な可変領域のフレームワーク（framework）配列の領域を含む工程、および（2）PCRの増幅に適する条件下でそのフラグメントを形成するために上記の関連ポリヌクレオチドまたはコピーをプールおよびフラグメント化し、それにより上記フラグメントを相同組換えして、CDRの新規な組み合わせを含む組換えポリヌクレオチドのシャッフルされたプールを形成する工程であって、それによって上記シャッフルされたプールの組換えポリヌクレオチドの実質的画分（例えば、10%を超える）が、第1の複数の選択されたライブラリーメンバー中に存在しないCDRの組み合わせを含み、上記シャッフルされたプールは、CDR順列を含み、そして親和性相互作用スクリーニングに適切なディスプレイされた抗体のライブラリーを構成する工程を包含する。必要に応じて、シャッフルされたプールは、予め決定されたエピトープ（抗原）に結合するシャッフルされたライブラリーメンバーを選択するための、親和性スクリーニングを受け、それにより複数の選択されるシャッフルされたライブラリーのメンバーを選択する。必要に応じて、複数の選択されるシャッフルされたライブラリーのメンバーは、1〜約1000サイクルまたは所望の結合親和性を有するライブラリーメンバーが得られるまで所望により、繰り返してシャッフルおよびスクリーニングされ得る。

【0048】従って、本発明の1つの局面は、1つ以上の変異をテンプレート2本鎖ポリヌクレオチド中へ導入する方法が提供される（ここで、テンプレート2本鎖ポリヌクレオチドは、切断されるかまたは（部分的伸長またはスタックリングにより）所望の大きさのランダムフラグメントにPCR増幅される）。本方法は、1つ以上の1本鎖または2本鎖オリゴヌクレオチドを、得られる

2本鎖フラグメントの集団に添加する工程であって、ここで上記オリゴヌクレオチドはテンプレートポリヌクレオチドに同一な範囲および非相同な範囲を含む、工程；2本鎖のランダムフラグメントおよびオリゴヌクレオチドの得られる混合物を1本鎖フラグメントに変性する工程；上記1本鎖フラグメント間の同一の領域で上記1本鎖フラグメントがアニールし、そして変異誘発された2本鎖ポリヌクレオチドが形成する条件下で、得られる1本鎖フラグメントの集団とポリメラーゼとをインキュベートする工程；および所望により上記の工程を反復する工程によってなされる。

【0049】別の局面において、本発明は、野生型タンパク質をコードする2本鎖テンプレートポリヌクレオチドを含有するサンプルを、上記テンプレートポリヌクレオチドを所望のサイズのランダムな2本鎖フラグメントへの切断を提供する条件下で処理する工程；1つ以上の1本鎖または2本鎖オリゴヌクレオチドを、得られるランダムフラグメントの集団に添加する工程であって、ここで上記オリゴヌクレオチドはテンプレートポリヌクレオチドに同一な範囲または非相同範囲を含む、工程；2本鎖のフラグメントおよびオリゴヌクレオチドの得られる混合物を1本鎖フラグメントに変性する工程；同一な範囲で上記1本鎖フラグメントがアニールし、そして変異誘発された2本鎖ポリヌクレオチドが形成する条件下で、得られる1本鎖フラグメントの集団とポリメラーゼとをインキュベートする工程；所望により上記の工程を反復する工程；次いで、変異誘発された2本鎖ポリヌクレオチドから組換えタンパク質を発現する工程により、生物学的活性を有する組換えタンパク質を生成する方法に関する。

【0050】本発明の第3の局面は、異なる2本鎖テンプレートポリヌクレオチドを含有するサンプルを処理することによってキメラポリヌクレオチドを得る方法に関する。ここで、上記の異なるテンプレートポリヌクレオチドは、上記テンプレートポリヌクレオチドを所望のサイズのランダムな2本鎖フラグメントへの切断を提供する条件下で、同一の範囲および非相同的な範囲を含む、工程；処理したサンプル中に含まれる得られるランダムな2本鎖フラグメントを、1本鎖フラグメントに変性させる工程；同一の範囲で1本鎖フラグメントのアニール、およびテンプレートポリヌクレオチド配列を含有するキメラ2本鎖ポリヌクレオチド配列の形成を提供する条件下で、得られる1本鎖フラグメントとポリメラーゼとをインキュベートする工程；および所望される場合は上記の工程を反復する工程を包含する。

【0051】本発明の第4の局面は、インビトロでの1本鎖テンプレートポリヌクレオチドと、テンプレートポリヌクレオチドを切断および変性することにより得られるランダムな1本鎖小フラグメントとを結合することによりテンプレートポリヌクレオチドを複製する方法、お

および2本鎖テンプレートポリヌクレオチドの集団が形成される条件下で、核酸ポリメラーゼの存在下で上記核酸フラグメントの混合物をインキュベートする方法に関する。

【0052】本発明はまた、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび/または転写調節配列を含有するポリヌクレオチドをシャッフルするための、インビトロおよび/またはインビボのポリヌクレオチドシャッフリングの使用を提供する。

【0053】本発明はまた、ウイルス遺伝子（例えば、キャプシドタンパク質、スパイク糖タンパク質、ポリメラーゼ、プロテアーゼなど）またはウイルスゲノム（例えば、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レオウイルス、ライノウイルスなど）の集団をシャッフルするための、ポリヌクレオチドシャッフリングの使用を提供する。1つの実施態様において、本発明は、免疫原ウイルスタンパク質の全てまたは一部をコードする配列をシャッフルして、新規のエピトープおよび組換えにより作製される新規のエピトープの組み合わせを生成する方法を提供する；このようなシャッフルされたウイルスタンパク質は、ウイルス進化の結果として天然の環境において生じようであるエピトープまたはエピトープの組み合わせをきみ得る（例えば、インフルエンザウイルス株の組換えなど）。

【0054】本発明はまた、有利な新規のポリペプチド（例えば、触媒、温度プロファイル、安定性、酸化耐性、または選択され得る他の所望の特徴の改変された特性を有する酵素）を作製および同定するために、タンパク質変異体（例えば、分類学的に関連する酵素、構造的に関連する酵素、および/または機能的に関連する酵素、ならびに/あるいはその変異した改変体）の集団をシャッフルするための、ポリヌクレオチドシャッフリングの使用を提供する。分子進化および指向された分子進化に適切な方法が提供される。ポリヌクレオチドの特異的な部分（例えば、コード領域のセグメント）に選択圧の焦点を合わせるための方法が提供される。

【0055】本発明はまた、遺伝子治療ベクター、およびヒト遺伝子治療のために使用され得るような複製能欠損の遺伝子治療構築物（DNAに基づくワクチン接種のためのワクチン注射ベクター、および抗新生物遺伝子治療、ならびに他の遺伝子治療形式を含むが、これらに限定されない）を生成するためのポリヌクレオチド配列のシャッフリングに適切な方法を提供する。

【0056】本発明は、増強された緑色蛍光タンパク質（GFP）およびそれをコードするポリヌクレオチドを生成するための方法を提供し、この方法は、GFPをコードする発現ベクター上でのDNAシャッフリングを行う工程および増強された所望の特性（例えば、増強された蛍光）を有する改変体を選択またはスクリーニングす

る工程を包含する。改変において、1つの実施態様は、誤りがちな増幅もしくは変異誘発性増幅、ミューテーター株（例えば、超変異誘発性表現型を有する宿主細胞；mut⁺など；Klein (1995) Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 51: 217に記載されるような酵母株（本明細書中で参考として援用される））における増殖、化学的変異誘発、または部位指定（site-directed）変異誘発の工程を包含する。1つの実施態様において、増強されたGFPタンパク質は、発色団領域（アミノ酸64～69）の外側に、好ましくはアミノ酸100～アミノ酸173までの領域に点変異を含み、特定の好ましい実施態様は、残基100、154、および164であり；代表的には、変異は置換変異（例えばF100S、M154T、V164A）である。1つの実施態様において、変異は、親水性残基を疎水性残基に置換する。1つの実施態様において、多重変異が、増強されたGFPタンパク質およびそれをコードするポリヌクレオチド中に存在する。本発明はまた、そのような増強されたGFPタンパク質の使用（例えば、アッセイおよび高スループットスクリーニングアッセイなどのための診断用レポーター）を提供する。

【0057】本発明はまた、インビトロで配列シャッフリングを行うための改善された実施態様を提供する。1つの局面において、改善されたシャッフリング方法は、関連配列ポリヌクレオチドの再アニーリングまたは組換えの率または程度を増大させる、少なくとも1つの添加剤の添加を含む。1つの実施態様において、添加剤はポリエチレングリコール（PEG）であり、代表的には、0.1～25パーセントの最終濃度まで、しばしば2.5～15パーセントの最終濃度まで、約10パーセントの最終濃度までシャッフリング反応に添加される。1つの実施態様において、添加剤はデキストラン硫酸であり、代表的には0.1～25パーセントの最終濃度まで、しばしば約10パーセントでシャッフリング反応に添加される。別の実施態様において、添加剤は、再アニーリングの配列特異性を低下させ、そして無差別なハイブリダイゼーションおよび／またはインビトロでの組換えを促進する試薬である。1つの実施態様において、添加剤は、再アニーリングの配列特異性を増大させ、そして高度に正確なハイブリダイゼーションおよび／またはインビトロでの組換えを促進する試薬である。反応を妨げない他の長鎖ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドンなど）がまた使用され得る。

【0058】1つの局面において、改善されたシャッフリング方法は、カチオン性界面活性剤である、少なくとも1つの添加剤の添加を含む。適切なカチオン性界面活性剤の例として、以下が挙げられるが、これらに限定されない：臭化セチルトリメチルアンモニウム（CTAB）、臭化ドデシルトリメチルアンモニウム（DTAB）、および塩化テトラメチルアンモニウム（TMA C）など。

【0059】1つの局面において、改善されたシャッフリング方法は、インビトロでの相同対形成および／または鎖交換を触媒するか、あるいは非触媒的に増強する組換えタンパク質である、少なくとも1つの添加剤の添加を含む。適切な組換えタンパク質の例として、以下が挙げられるが、これらに限定されない：E. coli recAタンパク質、T4 uvsXタンパク質、Ustilago maydis由来のrec1タンパク質、他の種由来の他のrecAファミリーリコンビナーゼ、1本鎖結合タンパク質（SSB）、リボヌクレオタンパク質A1など。シャッフリングは、組換えタンパク質の1つ以上の特性を改善するために使用され得る；例えば、recAをコードする変異配列がシャッフルされ得、そして改善された熱安定性改変体が、反復配列組換えによって選択される。

【0060】非特異的（一般的組換え）リコンビナーゼ（例えば、トポイソメラーゼI、トポイソメラーゼII（本明細書中で参考として援用される、Tseら、(1980) J. Biol. Chem. 255: 5560; Traskら、(1984) Embo J. 3: 671））などが、本発明の反復法によって複数の関連配列ポリヌクレオチドをシャッフルするためのインビトロの組換え反応を触媒するために使用され得る。

【0061】1つの局面において、改善されたシャッフリング方法は、非ブルフリーディングポリメラーゼによって触媒されるシャッフリング増幅反応において、生成物ポリヌクレオチドの3'末端に導入された非テンプレートヌクレオチドを除去することにおいて活性であるエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素である、少なくとも1つの添加剤の添加を含む。エキソヌクレアーゼ活性を有する適切な酵素の例として、Pfuポリメラーゼが挙げられるが、これに限定されない。他の適切なポリメラーゼとして、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Thermus flavus DNAポリメラーゼ（Tfl）、Thermus thermophilus DNAポリメラーゼ（Tth）、Thermococcus litoralis DNAポリメラーゼ（Tli、Vent）、Pyrococcus Woesei DNAポリメラーゼ（Pwo）、Thermotoga maritima DNAポリメラーゼ（UltMa）、Thermus brockianus DNAポリメラーゼ（Thermozyme）、Pyrococcus furiosus DNAポリメラーゼ（Pfu）、Thermococcus sp. DNAポリメラーゼ（9° Nm）、Pyrococcus sp. DNAポリメラーゼ（'Deep Vent'）、Bacteriophage T4 DNAポリメラーゼ、Bacteriophage T7 D

NAポリメラーゼ、E. coli DNAポリメラーゼI（天然の、およびクレノウ）、E. coli DNAポリメラーゼIII。

【0062】1つの局面において、改善されたシャッフリング方法は、再アニーリングしたフラグメント化ライブラリーメンバーであるポリヌクレオチドの少なくとも1サイクルの増幅（すなわちポリメラーゼを用いた伸長）が、実質的な画分（代表的には、不完全に伸長された増幅産物の少なくとも20%以上）を生成する条件化で行われる改変を含み、増幅産物（不完全に伸長した増幅産物を含む）は変性され、そしてさらに少なくとも1サイクルの再アニーリングおよび増幅に供される。少なくとも1サイクルの再アニーリングおよび増幅が、不完全に伸長された産物の実質的な画分を提供する、この改変は、「スタッタリング（stuttering）」と呼ばれ、そして続く増幅回において不完全に伸長された産物は再アニーリングし、そして別の配列関連テンプレート種において伸長をプライムする。

【0063】1つの局面において、改善されたシャッフリング方法は、少なくとも1サイクルの増幅が、第1のポリヌクレオチド種または関連配列ポリヌクレオチド種のセットに対応する種々の長さの重複する一本鎖DNAフラグメントの回収を用いて行われる改変を含み、ここで、各重複するフラグメントはそれぞれ、テンプレートとして作用する第2のポリヌクレオチド種にハイブリダイズし、そして第2のポリヌクレオチド種からのポリヌクレオチド鎖の伸長をプライムし、従って、配列組み替えされたポリヌクレオチドを形成し、ここで、上記の配列組換えポリヌクレオチドは、テンプレートとして作用する第2のポリヌクレオチド種の隣接部分を有する少なくとも1つの第1のポリヌクレオチド種の部分を含む。この改変において、テンプレートとして作用する第2のポリヌクレオチド種はウラシルを含み（すなわち、Kunkel型テンプレート）、そして細胞において実質的に複製可能でない。本発明のこの局面はまた、この改変の少なくとも2回の反復サイクルを含み得る。

【0064】1つの実施態様においてPCRが行われ得、ここでヌクレオチド混合物は、塩基としてウラシルを有するヌクレオチド種を含む。次いで、PCR産物は、鎖破壊を生じるUDG-グリコシラーゼでの消化によってフラグメント化され得る。フラグメントサイズは、PCR混合物中のウラシル含有NTPの画分によって制御され得る。

【0065】1つの局面において、改善されたシャッフリング方法は、少なくとも1サイクルの増幅が、テンプレートのスイッチング（switching）を促進する適切な条件下で添加剤またはポリメラーゼを用いて行われる改変を含む。Taqポリメラーゼが増幅のために使用される1つの実施態様において、recAまたは他のポリメラーゼ（例えば、ウイルスポリメラーゼ、逆転

写酵素）の添加は、テンプレートのスイッチングを増強する。テンプレートスイッチングはまた、当業者に公知の他の手段の中でも、DNAテンプレート濃度の増大によって増大され得る。

【0066】一般的な方法の1つの実施態様において、配列組換えポリヌクレオチドのライブラリーが、天然に存在する遺伝子または遺伝子の対立遺伝子である配列関連ポリヌクレオチドから作製される。この局面において、少なくとも70パーセントの配列同一性、好ましくは、少なくとも90パーセントの配列同一性を有する、少なくとも50の連続するヌクレオチドの領域を含む、少なくとも2つの天然に存在する遺伝子および／または対立遺伝子が、例えば、ハイブリッド選択によるか、またはデータベースからの配列データを用いるコンピューターによる配列分析を通じて、遺伝子配列のプールから選択される。1つの局面において、少なくとも70パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも90パーセントの配列同一性を有する、少なくとも50の連続するヌクレオチドの領域を含む、少なくとも3つの天然に存在する遺伝子および／または対立遺伝子が、例えば、ハイブリッド選択によるか、またはデータベースからの配列データを用いるコンピューターによる配列分析を通じて、遺伝子配列のプールから選択される。選択された配列は、クローニングによって、またはDNA合成を通じてのいずれかでポリヌクレオチドとして得られ、そして本発明の任意の種々の実施態様によってシャッフルされる。

【0067】本発明の1つの実施態様において、多重プール（multi-pool）シャッフリングが行われる。ポリヌクレオチド配列の多重プールのシャッフリングは、それぞれ別のプールが、所望の特性を生じるための異なる組換え溶液を生成することを可能にする。この改変において、親のポリヌクレオチド配列のプール（または、任意の続いてシャッフルされたライブラリーまたはライブラリーメンバーの選択されたプール）が、2以上の別の配列のプールに細分（または分離）され、そして1回以上の反復配列組換えおよび選択（またはスクリーニング）に別々に供される。所望される場合は、必要に応じて、それぞれの別のプールからの選択されたライブラリーのメンバーが、シャッフリングの最後の回において組換えされ（または、組み込まれ）得る。あるいは、多重に分離された親のプールが使用され得る。プール内の選択された（またはスクリーニングされた）ライブラリーのメンバーが、本発明の反復配列組換え方法によって互いに交差される同系交配（inbreeding）は、単独で、または別のプールのライブラリーのメンバーが本発明の反復配列組換え方法によって互いに交差される異系交配（outbreeding）と組み合わせで行われ得る。

【0068】本発明の実施態様において、この方法は、

任意の開示されたシャッフリング方法によって生成された配列組換えポリヌクレオチドから、シャッフリングされていない産物（例えば、親配列）を取り除くさらなる工程を含む。シャッフリングされていない産物は：（１）第１の親ポリヌクレオチド種にハイブリダイズするが、第２の親ポリヌクレオチド種には実質的にハイブリダイズしない第１のPCRプライマー、および（２）第２の親ポリヌクレオチド種にハイブリダイズするが、第１の親ポリヌクレオチド種には実質的にハイブリダイズしない第２のPCRプライマーを用いる増幅を行うことによって、取り除かれるかまたは発生を避けられ得、その結果、増幅は、第１のPCRプライマーにハイブリダイズする第１の親配列の部分を含み、そして第２のPCRプライマーにハイブリダイズする第２の親配列の部分をも含むテンプレートから生じ、従って、配列組換えポリヌクレオチドのみが増幅される。

【0069】本発明はまた、インビボでの配列シャッフリングを行うための別の実施態様を提供する。１つの局面において、別のシャッフリング方法は、プラスミド間（inter-plasmidic）組換えの使用を含み、ここで、配列組換えポリヌクレオチド配列のライブラリーは、適切な宿主細胞内で、適合性または非適合性のマルチコピープラスミドのインビボでの遺伝子組換えによって得られる。非適合性プラスミドが使用される場合、代表的には、各プラスミド型は別々の選択マーカーを有し、そして各所望のプラスミド型の維持についての選択が適用される。組換えされる関連配列ポリヌクレオチド配列は、別々に複製可能なマルチコピーベクター（代表的には、異なる別々に選択可能なマーカー遺伝子（例えば、薬剤耐性遺伝子）をそれぞれ有する細菌プラスミド）に別々に組み込まれる。適切な宿主細胞は、両方のプラスミド種を用いて形質転換され、両方の選択マーカー遺伝子を発現する細胞が選択され、配列組換えされた配列が回収され、そして本明細書中に記載される任意の手段によるシャッフリングのさらなる回に供される。

【0070】１つの局面において、別のシャッフリング方法は、プラスミド内（intra-plasmidic）組換えの使用を含む。ここで、配列組換えされたポリヌクレオチド配列のライブラリーは、同じプラスミド上に位置する直列配列反復または逆方向配列反復のインビボでの遺伝子組換えによって得られる。この改変において、組換えされる配列は、部位特異的組換え配列に隣接され、そしてポリヌクレオチドはインテグロン（integron）（本明細書中で参考として援用される、HallおよびCollins（1995）Mol. Microbiol. 15: 593）のような部位特異的組換えシステムにおいて存在し、そしてトランスポゾン（例えば、IS1）などの挿入配列を含み得る。イントロンは、低率の天然の移動度を有し、そして原核

生物および真核生物の両方において移動性遺伝的エレメントとして使用され得る。シャッフリングは、移動性遺伝的エレメントの能力を改善するために使用され得る。これらの高頻度の組換えビヒクルは、大きな配列ブロックの転移を介する大きな配列の迅速な最適化のために使用され得る。反復した、散在した、そして分かれたDNA配列であり、そして「同種（homeologous）」配列とも呼ばれる配列間の組換えは、代表的には通常の細胞において抑制される。しかし、MutLおよびMutS細胞において、この抑制は解除されており、そして染色体内組換えの割合が増大している（本明細書中で参考として援用される、Petitら（1996）Genetics 129: 327）。

【0071】本発明の１つの局面において、宿主細胞のミューテーター株は、より高度にミスマッチな配列関連ポリヌクレオチドの組換えを増大させるために使用される。細菌株（例えば、MutL、MutS、MutT、またはMutH）あるいはMutタンパク質を発現する他の細胞（XL-1red；Stratagene, San Diego, CA）は、インビボでの組換えによる配列関連ポリヌクレオチドのシャッフリングのための宿主細胞として使用され得る。ブルーフリーディング欠損ポリメラーゼを有するような、他の変異しがちな（mutation-prone）宿主細胞型がまた使用され得る（本明細書中で参考として援用される、Fosterら（1995）Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 92: 7951）。酵母のミューテーター株が使用され得、同様に、ataxia telangiectasia細胞（例えば、本明細書中で参考として援用される、Luoら（1996）J. Biol. Chem. 271: 4497に記載される）を含む超変異誘発性哺乳動物細胞が使用され得る。

【0072】宿主細胞に化学的変異原または放射性変異原を投与する工程を包含する、他のインビボおよびインビトロでの変異誘発形式が使用され得る。このような変異原の例として、以下が挙げられるが、これらに限定されない：MNU、ENU、MNNG、ニトロソ尿素（nitrosourea）、BuDRなど。紫外線がまた、変異を生成するためおよび／または組換え率を増大させるために、例えば、インビボでの組換えを増強するために使用される細胞の照射によって使用され得る。電離放射線および染色体異常誘発性（clastogenic）剤がまた、変異頻度を増大するためおよび／または組換えを増大させるためおよび／またはポリヌクレオチドフラグメント化を効果的にするために使用され得る。

【0073】

【発明の実施の形態】本発明は、DNA配列の変異誘発に対するランダムフラグメント化およびその適用後

に、核酸分子再組立の方法に関する。増強された生物学的活性を有する変異タンパク質をコードする核酸フラグメントを生成する方法もまた記載される。特に、本発明はまた、増強された生物学的活性を有する変異タンパク質の作製を可能にする変異誘発、核酸シャッフリングおよび選択の反復サイクルの方法に関する。

【0074】本発明はDNA、RNA、またはタンパク質変異体の非常に大規模なライブラリーを生成する方法に関する；代謝酵素または複数の成分からなる経路がシャッフリングに供される実施態様において、ライブラリーは、シャッフされた酵素のライブラリーに加えて生じた代謝物を含み得る。この方法は、所望の核酸フラグメントが選択され得る関連DNAフラグメントの生成において特定の利点を有する。特に本発明はまた、増強された生物学的活性を有する変異タンパク質の作製を可能にする変異誘発、相同組換えおよび選択の反復サイクルの方法に関する。

【0075】しかし、本発明をさらに詳細に考察する前に、まず以下の用語が定義される。

【0076】(定義) 本明細書で使用される以下の用語は、以下の意味を有する：用語「DNA再組立」は、同一の配列の間で組換えが生じる場合に使用される

【0077】対照的に、用語「DNAシャッフリング」は、実質的に相同であるが同一ではない配列の間の組換えを示すために本明細書で使用され、いくつかの実施態様において、DNAシャッフリングは非相同な組換え（例えば、*cre*/*lox*および/または*flp*/*frt*システムなど）を介する交差を含み得る。従って、組換えは、実質的に相同なポリヌクレオチド配列を必要とはしない。相同組換えおよび非相同組換え形式が使用され得、そしていくつかの実施態様において、実質的に類似でない配列の分子キメラおよび/または分子ハイブリッドが生成され得る。

【0078】用語「増幅」は、核酸フラグメントのコピー数が増加することを意味する。

【0079】用語「同一な」または「同一性」は、2つの核酸配列が同じ配列または相補的な配列を有することを意味する。従って、「同一の範囲」は、核酸フラグメントまたはポリヌクレオチドの領域または範囲が、別のポリヌクレオチドまたは核酸フラグメントに同一または相補的であることを意味する。

【0080】用語「対応する」は、ポリヌクレオチド配列が参照ポリヌクレオチド配列の全てまたは一部分に相同である（すなわち同一であり、厳密には進化的に関連しない）こと、またはポリヌクレオチド配列が参照ポリヌクレオチド配列に同一であることを意味するために本明細書において使用される。対照的に、用語「相補する」は、相補的な配列が参照ポリヌクレオチド配列の全てまたは一部分に相同であることを意味するために本明細書で使用される。例えば、核酸配列「TATAC」は、参照配列

「TATAC」に対応し、そして参照配列「GTATA」に相補的である。

【0081】以下の用語は、2つ以上のポリヌクレオチド間での配列の関係を記載するために使用される：「参照配列」、「比較領域 (comparison window)」、「配列同一性」、「配列同一性のパーセンテージ」、および「実質的な同一性」。「参照配列」は、配列比較のための基本として使用される規定の配列である；参照配列は、より大きな配列のサブセット（例えば、配列表に示される全長cDNAまたは遺伝子配列のセグメント（例えば、図1または図2(b)のポリヌクレオチド配列））であり得るか、または参照配列は完全なcDNAまたは遺伝子配列を含有し得る。一般的に、参照配列は少なくとも20ヌクレオチドの長さであり、頻繁には少なくとも25ヌクレオチドの長さであり、そしてしばしば少なくとも50ヌクレオチドの長さである。2つのポリヌクレオチドが、それぞれ(1) 2つのポリヌクレオチド間で類似の配列（すなわち、完全なポリヌクレオチド配列の一部分）を含有し得、そして(2) 2つのポリヌクレオチド間で互いに一致しない配列をさらに含有し得るので、2つ（またはそれ以上）のポリヌクレオチド間の配列比較は、代表的には、「比較領域」にわたる2つのポリヌクレオチドの配列を比較することにより実施され、配列が類似する局所領域を同定および比較する。

【0082】本明細書で使用される「比較領域」は、少なくとも20の隣接するヌクレオチドの位置の概念上のセグメントをいい、ここでポリヌクレオチド配列が少なくとも20の隣接するヌクレオチドの参照配列と比較され得、そしてここでは比較領域におけるポリヌクレオチド配列の部分が、2つの配列の最適アラインメントのために、参照配列（付加または欠失を含まない）に比べて20%以下の付加または欠失（すなわちギャップ）を含み得る。比較領域を並べるための、配列の最適アラインメントは、SmithおよびWaterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482の局所相同性アルゴリズムにより、NeedlemanおよびWunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443の相同性アラインメントアルゴリズムにより、PearsonおよびLipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)* 85:2444の類似度方法に関するサーチにより、これらのアルゴリズム (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetic Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA) のコンピュータ実行により、または検査により行われ得、そして種々の方法により生成される最も良いアラ

インメント(すなわち、比較領域にわたる最も高い相同性パーセンテージを与える)が、選択される。

【0083】用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチド配列が比較領域にわたって(すなわち、1ヌクレオチド対ずつで)同一であることを意味する。用語「配列同一性のパーセンテージ」は、最適に並べられた2つの配列を比較領域にわたって比較し、同一の核酸塩基(例えば、A、T、C、G、U、またはI)が両方の配列において生じる位置の数を測定し、一致した位置の数を得、一致した位置の数を比較領域における位置の総数(すなわち、比較サイズ)で割り、そしてこの結果に100を掛けて、配列同一性のパーセンテージを得ることにより、算定される。本明細書で使用される用語「実質的同一性」は、ポリヌクレオチド配列の特徴を示し、ここではポリヌクレオチドは、少なくとも20のヌクレオチド位置の比較領域にわたり、頻繁には少なくとも25〜50ヌクレオチドの領域にわたり参照配列と比較して、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも85%の同一性、そしてしばしば90%〜95%の配列同一性、最も通常には少なくとも99%の配列同一性を有する配列を包含し、ここでは配列同一性のパーセンテージは、ポリヌクレオチド配列を参照配列と比べることにより算定され、このポリヌクレオチド配列は、比較領域にわたり、全体で参照配列の20%以下の欠失または付加を含み得る。

【0084】保存的アミノ酸置換は、類似側鎖を有する残基の互換性をいう。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸のグループは、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり；脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸のグループはセリンおよびスレオニンであり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸のグループはアスパラギンおよびグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸のグループは、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンであり；塩基性側鎖を有するアミノ酸のグループは、リジン、アルギニン、およびヒスチジンであり；そしてイオウ含有側鎖を有するアミノ酸のグループは、システインおよびメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸の置換グループは：バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、およびアスパラギン-グルタミンである。

【0085】用語「相同」または「同種(homologous)」は、ある1本鎖核酸配列が相補的な1本鎖核酸配列にハイブリダイズし得ることを意味する。ハイブリダイゼーションの程度は、配列間の同一性の量およびハイブリダイゼーション条件(例えば、後述するような温度および塩濃度)を包含する多数の要素に依存し得る。好ましくは同一な領域は約5bpより多くであり、より好ましくは同一な領域は10bpより多くである。

【0086】用語「非相同」は、ある1本鎖核酸配列が別の1本鎖核酸配列またはその相補鎖にハイブリダイズし得ないことをいう。従って非相同な範囲は、核酸フラグメントまたはポリヌクレオチドが、別の核酸またはポリヌクレオチドにハイブリダイズし得ない配列中の範囲または領域を配列中に有することを意味する。このような領域または範囲は、例えば、変異の範囲である。

【0087】本明細書で使用される用語「同族」は、種間で進化的におよび機能的に関連付けられる遺伝子配列をいう。これに限定されないが例えば、ヒトゲノムにおいては、ヒトCD4遺伝子は、マウスCD4遺伝子の同族遺伝子である。なぜならこれらの2つの遺伝子の配列および構造が、それらが高度に相同であることを示し、そして両方の遺伝子が、MHCクラスII-制限抗原認識を介してT細胞活性化をシグナルすることに機能するタンパク質をコードしているからである。

【0088】用語「野生型」は、核酸フラグメントがいかなる変異も含まないことを意味する。「野生型」タンパク質は、このタンパク質が天然に見られる活性のレベルで活性であり、そして代表的には、天然に見られるアミノ酸配列を含有することを意味する。1つの局面において、用語「野生型」または「親配列」は、本発明の操作の前に開始配列または参照配列を示し得る。

【0089】用語「関連ポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドの領域または範囲が同一であり、かつポリヌクレオチドの領域または範囲が非相同であることを意味する。

【0090】用語「キメラポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドが野生型である領域および変異を受けた領域を含むことを意味する。ポリヌクレオチドが、あるポリヌクレオチドに由来する野生型領域および別の関連ポリヌクレオチドに由来する野生型領域を含むこともまた意味する。

【0091】用語「切断」は、ポリヌクレオチドを酵素で消化すること、もしくはポリヌクレオチドを破壊すること、または部分的PCR伸長、PCRスタックリング、ディファレンシャルフラグメント増幅、もしくは1つ以上の親配列の部分的な長さのコピーを生成する他の手段による、親配列の部分的な長さのコピーを生成することを意味する。

【0092】本明細書で使用される用語「集団」は、ポリヌクレオチド、核酸フラグメント、またはタンパク質のような成分の集合を意味する。「混合集団」は、核酸またはタンパク質の同じファミリーに属する(すなわち関連する)が、それらの配列において異なり(すなわち同一ではない)、それゆえそれらの生物学的活性においても異なる成分の集合を意味する。

【0093】用語「特定核酸フラグメント」は、特定の終点を有し、そして特定核酸配列を有する核酸フラグメントを意味する。2つの核酸フラグメント(ここでは1

つの核酸フラグメントが第2の核酸フラグメントの一部と同一の配列を有するが、異なる末端を有する)は、2つの異なる特定核酸フラグメントを包含する。

【0094】用語「変異」は、野生型核酸配列の配列における変化、またはペプチドの配列における変化を意味する。このような変異は、トランジションまたはトランスバージョンのような点変異であり得る。変異は欠失、挿入、または重複であり得る。

【0095】本明細書で使用されるポリペプチド表記において、標準的な慣習および慣用に従って、左側方向がアミノ末端方向であり、そして右側方向がカルボキシ末端方向である。同様に、他で特定しないかぎり、1本鎖ポリヌクレオチド配列の左側の末端は5'末端であり；2本鎖ポリヌクレオチド配列の左側方向は5'方向という。新生RNA転写産物の5'から3'付加の方向を、転写方向といい；RNAと同じ配列を有し、およびRNA転写産物の5'末端の5'側にであるDNA鎖上の配列領域を「上流配列」といい；RNAと同じ配列を有し、そしてコードRNAの転写産物の3'末端の3'側にあるDNA鎖上の配列領域を「下流配列」という。

【0096】本明細書で使用される用語「天然に存在する」は、ある物体に適用されるように、ある物体が天然に見出され得る事実をいう。例えば、供給源から天然に単離され得、研究室においてヒトにより故意に改変されていない生物（ウイルスを含む）に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、天然に存在する。一般的に、用語天然に存在するは、種に代表的であるような非病的（非疾患）個体に存在する物体をいう。

【0097】本明細書で使用される用語「薬剤」は、化合物、化合物の混合物、場所的に局在する化合物の配列（例えば、VLSIPSペプチド配列、ポリヌクレオチド配列、および/または結合小分子配列）、生体高分子、バクテリオファージのペプチドディスプレイライブラリー、バクテリオファージ抗体（例えば、scFv）ディスプレイライブラリー、ポリソームペプチドディスプレイライブラリー、または細菌、植物、真菌、または動物（特に哺乳動物）細胞または組織のような生体物質から作製される抽出物を示す。薬剤は、本明細書の以下に記載されるスクリーニングアッセイに含めることにより、抗新生物剤、抗炎症剤、またはアポトーシスモジュレーターとしての潜在的活性について評価される。薬剤は、本明細書の以下に記載されるスクリーニングアッセイに含めることにより、特定のタンパク質相互作用のインヒビター（すなわち、2つの予め決定されたポリペプチド間の結合相互作用を選択的に阻害するが、細胞の生存性を実質的に阻害しない薬剤）としての潜在的活性について評価される。

【0098】本明細書で使用されるように、「実質的に純粋な」は、対象種が存在する優勢種であること（すなわち、モル濃度に基づき、組成において他の任意の個々

の高分子種よりも豊富であること）を意味し、そして好ましくは実質的に精製された画分は、対象種が、存在する全ての高分子種の少なくとも約50%（モル濃度に基づき）を含む組成である。一般的には、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在する全高分子種の約80%～90%より多くを含有する。最も好ましくは、対象種は本質的に均質にまで精製され（汚染種が従来の検出方法により組成物中に検出され得ない）、ここでは組成物は本質的に単一の高分子種からなる。溶媒種、小分子（＜500ダルトン）、および元素イオン種は高分子種とは見なさない。

【0099】本明細書で使用される用語「生理学的条件」は、温度、pH、イオン強度、粘性率、および同様の生物学的パラメーターをいい、これらは生存可能な生物と適合可能であり、そして/または生存可能な酵母培養細胞または哺乳動物培養細胞において細胞内に代表的に存在する。例えば、代表的な実験室培養条件下で増殖される酵母細胞における細胞内条件は、生理学的条件である。インビトロ転写反応混液に適切なインビトロ反応条件は、一般的に生理学的条件である。一般に、インビトロ生理学的条件は50～200mM NaClまたはKCl、pH6.5～8.5、20～45℃、および0.001～10mM 二価カチオン（例えば、Mg²⁺、Ca²⁺）；好ましくは約150mM NaClまたはKCl、pH7.2～7.6、5mM 二価カチオンを含有し、そしてしばしば0.01～1.0%の非特異的タンパク質（例えば、BSA）を含有する。非イオン性界面活性剤（Tween、NP-40、Triton X-100）が、通常約0.001%～2%、代表的には0.05%～0.2%（v/v）でしばしば存在し得る。特定の水性条件は従来の方法に従って当業者により選択され得る。一般的な手引きのために、以下の緩衝化水性条件が適用可能であり得る：10～250mM NaCl、5～50mM Tris HCl、pH5～8、二価カチオン（1種類または複数）および/または金属キレート剤および/または非イオン性界面活性剤および/または膜画分および/または消泡剤および/または発光剤（scintillant）の最適な添加を有する。

【0100】本明細書において、特異的ハイブリダイゼーションは、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチド（例えば、第1のポリヌクレオチドと区別されるが実質的には同一の配列を有するポリヌクレオチド）との間のハイブリッドの形成として定義され、ここでは、実質的に関連のないポリヌクレオチド配列が混合物中でハイブリッドを形成しないストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、第1のポリヌクレオチドは優先して第2のポリヌクレオチド配列にハイブリダイズする。

【0101】本明細書で使用される用語「単鎖抗体」

は、ポリペプチド結合において V_H ドメインおよび V_L ドメインを含むポリペプチドをいい、一般的にスパーペプチド（例えば、 $[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_x$ ）を介して接続され、アミノ末端および／またはカルボキシ末端で付加的なアミノ酸配列を含み得る。例えば、単鎖抗体はコード化ポリヌクレオチドに結合するために、つなぎ（tether）セグメントを含み得る。一例として、scFvは、単鎖抗体である。単鎖抗体は一般に、免疫グロブリンスーパーファミリーの遺伝子により実質的にコードされる、少なくとも10個の隣接するアミノ酸の1つ以上のポリペプチドセグメントからなるタンパク質である（例えば、The Immunoglobulin Gene Superfamily, A. F. WilliamsおよびA. N. Barclay, Immunoglobulin Genes, T. Honjo, F. W. Alt, およびT. H. Rabbitts編（1989）Academic Press: San Diego, CA, 361-387頁（本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。最も頻繁には単鎖抗体は、齧歯類、ヒト以外の霊長類、トリ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、またはヒトの重鎖遺伝子配列または軽鎖遺伝子配列によりコードされる。一般に、機能的な単鎖抗体は、免疫グロブリンスーパーファミリー遺伝子産物の十分な部分を含有しており、特定標的分子（代表的にはレセプターまたは抗原（エピトープ））に対する結合特性を保有する。

【0102】本明細書で使用されるように、用語「相補性決定領域」および「CDR」は、KabatおよびChothiaにより例証される技術認識用語をいう。一般に、CDRの定義は、高頻度可変領域または高頻度可変ループ（ChothiaおよびLesk（1987）J. Mol. Biol. 196:901; Chothiaら（1989）Nature 342:877; E. A. Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD)（1987）; およびTramontanoら（1990）J. Mol. Biol. 215:175）としてもまた知られる。可変領域のドメインは、代表的に、天然に存在する免疫グロブリン鎖のアミノ末端の約105～115アミノ酸（例えば、アミノ酸1～110）を含むが、いくらか短いまたは長い可変ドメインはもまた、単鎖抗体の形成に適している。

【0103】免疫グロブリンの軽鎖可変領域または重鎖可変領域は、CDRとも呼ばれる3つの高頻度可変領域により中断される「フレームワーク」領域からなる。フレームワーク領域およびCDRの範囲は正確に定義され

ている（「Sequences of Proteins of Immunological Interest」E. Kabatら, 第4版, U. S. Department of Health and Human Services, Bethesda, MD（1987）を参照のこと）。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は種内で比較的保存されている。本明細書で使用される「ヒトフレームワーク領域」は、天然に存在するヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域に実質的に同一（約85%以上、通常は90%～95%以上）であるフレームワーク領域である。抗体のフレームワーク領域（すなわち、構成要素の軽鎖および重鎖の結合フレームワーク領域）は、CDRの位置および配列に作用する。CDRが主に、抗原のエピトープへの結合を担う。

【0104】本明細書で使用される用語「可変セグメント」は、ランダムな配列、偽似ランダムな配列、または規定の核配列を含む新生ペプチドの一部分をいう。可変セグメントは、可変残基位置および不変残基位置の両方を含み得、そして可変残基位置での残基の変化の程度は制限され得る；両方の選択とも実施者の判断で選択される。代表的に、可変セグメントは約5～20アミノ酸残基長（例えば、8～10）であるが、可変セグメントはより長くあり得、そして抗体部分またはレセプター（例えば、抗体フラグメント、核酸結合タンパク質、レセプタータンパク質など）を含み得る。

【0105】本明細書で使用される「ランダムペプチド配列」は、2つ以上のアミノ酸モノマーからなり、そして確率的なプロセスまたはランダムなプロセスにより構築されるアミノ酸配列をいう。ランダムなペプチドはフレームワークモチーフまたは骨組みモチーフを含み得、不変配列を含み得る。

【0106】本明細書で使用される「ランダムペプチドライブラリー」は、一セットのランダムペプチドをコードするポリヌクレオチド配列のセットをいい、そしてこれらのポリヌクレオチド配列によりコードされるランダムペプチドのセット、ならびにこれらのランダムペプチドを含む融合タンパク質をいう。

【0107】本明細書で使用される用語「疑似ランダム」は、限定された可変性を有する配列のセットをいい、これにより、例えば、ある位置での残基の可変性の程度が別の位置の残基の可変性の程度と異なる。しかし任意の疑似ランダム位置は、ある程度の残基の変化を可能にするが、制限される。

【0108】本明細書で使用される用語「規定の配列フレームワーク」は、一般的に実験データまたは構造データを基礎として、非ランダムに選択される規定の配列のセットをいい；例えば、規定の配列フレームワークは、 β シート構造を形成すると予想されるアミノ酸配列のセットを含み得るか、または他の変化の間にロイシンジッ

パーの7個の反復モチーフ、亜鉛フィンガードメインを含み得る。「規定の配列核」は、可変性の制限範囲を含む配列のセットである。(1) 20個の従来のアミノ酸の完全にランダムな10マーの配列は、 $(20)^{10}$ 個の配列のいずれかであり得、そして(2) 20個の従来のアミノ酸の疑似ランダムな10マーの配列は $(20)^{10}$ 個の配列のいずれでもあり得るが、特定の位置および／または全体で特定の残基に偏りが表れ、(3) 規定の配列核は、それぞれの残基位置が可能である20個の従来のアミノ酸(および／または可能な比従来型のアミノ酸／イミノ酸)のいずれでもあることが可能とされた場合、可能な配列の最大数よりも少なくなる配列のサブセットである。一般に、規定の配列核は、個々の選択されたライブラリーメンバー配列のセグメントまたは全長のいずれかに、可変残基位置および不変残基位置を含み、そして／またはアミノ酸残基の規定のサブセットから選択される残基を含み得る可変残基位置を包むなどである。規定の配列核は、アミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列のいずれかをいい得る。これらに限定されないが例えば、配列 $(NNK)_{10}$ および $(NNH)_{10}$ は、配列核であると定義される(ここでNはA、T、G、またはCを表し；Kは、GまたはTを表し；そしてMはAまたはCを表す)。

【0109】本明細書で使用される「エピトープ」は、抗体の可変領域結合ポケットと相互作用する結合相互作用を形成し得る抗原または他の高分子の一部をいう。代表的に、このような結合相互作用はCDRの1つ以上のアミノ酸残基の分子間接触として示される。

【0110】本明細書で使用される「レセプター」は、所定のリガンドに親和性を有する分子をいう。レセプターは天然に存在する分子または合成分子であり得る。レセプターは不変状態においてまたは他の種とともに集合体として使用され得る。レセプターは、共有結合的または非共有結合的に、直接または特異的な結合物質を介してのいずれかで、結合メンバーに付着され得る。レセプターの例は、抗体(特定の抗原決定基(例えば、ウイルス、細胞、または他の物質)と反応するモノクローナル抗体および抗血清を包含する)、細胞膜レセプター、炭水化物および糖タンパク質の複合体、酵素、およびホルモンレセプターを包含するがこれらに限定されない。

【0111】本明細書で使用される「リガンド」は、ランダムペプチド配列または可変セグメント配列のような、特定のレセプターで認識される分子をいう。当業者の認識するところによれば、分子(または高分子複合体)は、レセプターおよびリガンドの両方であり得る。一般的に、小分子量を有する結合対をリガンドといい、そして大きな分子量を有する結合対をレセプターという。

【0112】本明細書で使用される「リンカー」または「スペーサー」は、2つの分子(例えば、DNA結合タ

ンパク質およびランダムペプチド)を結合させる分子または分子のグループをいい、そして好ましい配置にその2つの分子を置くように供せられる。これにより、例えば、ランダムペプチドは、DNA結合タンパク質から最少の立体障害でレセプターに結合し得る。

【0113】本明細書で使用される用語「作動可能に連結される」は、機能的関係におけるポリヌクレオチドエレメントの連結をいう。核酸が、別の核酸配列と機能的関係に置かれる場合、核酸は「作動可能に連結される」。例えば、プロモーターまたはエンハンサーが、コード配列の転写に影響する場合、これはコード配列に作動可能に連結される。作動可能に連結されるとは、代表的に、連結されるDNA配列が隣接されることを意味し、2つのタンパク質コード領域を接続することが必要である場合、隣接されかつリーディングフレーム内にある。

【0114】本明細書中で使用される用語「反復配列組換え」は、ポリヌクレオチド配列の集団が任意の適切な組換え手段(例えば、有性PCR、相同組換え、部位特異的組換えなど)によって互いに組換えられ、これは配列組換え種のライブラリーを生成し、次いで所望の特性を有する配列組換え種を得るためにスクリーニングされるかまたは選択に供される方法をいう；次いで、選択された種は、それ自身および／または他のポリヌクレオチド種との少なくとも1回の組換えのさらなるサイクル、および続く所望の特性についての選択またはスクリーニングに供される。

【0115】一般に、スクリーニングは、その1回目が、どの細胞がスクリーニングマーカーを発現しそしてどの細胞が発現しないかを決定する工程、そして次に所望の特性を有する細胞を物理的に分離する工程である、2工程プロセスである。選択は、同定および物理的分離が選択マーカーの発現によって同時に達成されるスクリーニングの形態であり、いくつかの遺伝子の状況において、これにより、マーカーを発現する細胞は生存でき、そして他の細胞は死亡する(または逆)。スクリーニングマーカーとして、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、および緑色蛍光タンパク質が挙げられる。選択マーカーとして、薬剤および毒素耐性遺伝子が挙げられる。自発的な選択が、自然の進化の過程で生じ得、そして生じるが、本方法において、選択は人によって行われる。

【0116】(方法論)核酸シャッフリングは、核酸フラグメントまたはポリヌクレオチドのプールをインビトロまたはインビボで反復的に相同組換えする方法である。関連核酸配列またはポリヌクレオチドの混合物を、ランダムにまたは疑似ランダムにフラグメント化し、そして再組立して、組換え核酸分子またはポリヌクレオチドのライブラリーまたは混合集団を生じる。

【0117】カセット変異誘発とは対照に、シャッフリ

ングおよび誤りがちなPCR（または他の変異増強法の使用；化学的変異誘発、ミューテーター株など）のみが、（プライマー以外の配列情報なしで）配列のプールを盲目的に変異させる。

【0118】反復的選択について誤りがちなPCRよりも優れている本発明の変異誘発的シャッフリングの利点は、抗体工学からの例を用いて最も良く説明され得る。図1に、本明細書で記載されるDNAシャッフリングの概略図が示される。開始ライブラリーは、多様な起源の関連配列（すなわち、天然mRNA由来の抗体）からなり得るか、または単一抗体遺伝子の任意の型の変異誘発（シャッフリングを包含する）に由来し得る。選択される相補性決定領域（「CDR」）の集合は、一回目の親和性選択後に得られる（図1）。図において、太いCDRは、抗体分子に抗原に対して増加した親和性を与える。シャッフリングは、全てのCDR1と全てのCDR2および全てのCDR3などとの自由な組み合わせの結合を可能にする（図1）。

【0119】この方法は、逆鎖反応である点でPCRとは異なる。PCRでは、分子の数は指数関数的に増加する。しかし、シャッフリングにおいては、ポリメラーゼ開始部位の数および分子の数は本質的に同じままである。分子をさらに伸長させるために希釈が使用される場合、シャッフリングプロセスはより少ない分子を生成する逆鎖反応となる。

【0120】相同な領域で交差が生じるので、組換えは主に同じ配列ファミリーのメンバー間で生じる。このことは、ひどく不適合性である（例えば、同じ抗原の異なるエпитープに対する）CDRの組み合わせを防止する。配列の多数のファミリーが同じ反応においてシャッフリングされ得ることが意図される。さらに、シャッフリングは相対的順位を保存するので、例えば、CDR1は、CDR2の位置では見出されない。

【0121】まれにシャッフリング体は多数の最良の（例えば、最高の親和性の）CDRを含み、そしてこれらのシャッフリング体はまれにそれらの優れた親和性に基づいて選択され得る（図1）。

【0122】100個の異なる選択された抗体配列のプールに由来するCDRは、100⁶通りまで順序変えされ得る。この多数の順序変えはDNA配列の単一のライブラリーでは表し得ない。従って、DNAシャッフリングおよび選択の多数のサイクルが、配列の長さおよび所望の配列の多様性に依存して必要とされ得ることが意図される。

【0123】反対に、誤りがちなPCRは全ての選択されたCDRを同じ関連配列中に保ち（図1）、生成する変異体はよりずっと小さい。

【0124】本発明の方法において使用され得るテンプレートポリヌクレオチドは、DNAまたはRNAであり得る。それは、組換えまたは再組立される遺伝子または

DNAフラグメントの大きさに依存して種々の長さであり得る。好ましくは、テンプレートポリヌクレオチドは50bp〜50kbである。目的のタンパク質をコードする核酸を含有する完全なベクターが、本発明の方法において使用され得ることが意図され、そして実際に首尾良く使用されている。

【0125】テンプレートポリヌクレオチドは、PCR反応（米国特許第4,683,202号および第4,683,195号）または他の増幅方法またはクローニング方法を使用する増幅により得られ得る。しかし、フラグメント化する前にPCR産物から遊離プライマーを除去すると、より効率的な結果が提供される。プライマーを十分に除去し損なうと、低頻度の交差クローンが導かれ得る。

【0126】テンプレートポリヌクレオチドはしばしば、2本鎖であるべきである。2本鎖核酸分子は、得られる1本鎖核酸フラグメントの領域が互いに相補的で、従って、ハイブリダイズして2本鎖分子を形成し得ることを確実にすることが要求される。

【0127】テンプレートポリヌクレオチドに同一な領域およびテンプレートポリヌクレオチドに非相同な領域を有する1本鎖または2本鎖核酸フラグメントが、この工程で、テンプレートポリヌクレオチドに添加され得ることが意図される。2つの異なるが関連したポリヌクレオチドテンプレートがこの工程で混合され得ることもまた意図される。

【0128】2本鎖ポリヌクレオチドテンプレートおよび任意の添加される2本鎖フラグメントまたは1本鎖フラグメントは、約5bp〜5kb以上のフラグメントにランダムに消化される。好ましくは、ランダムフラグメントの大きさは約10bp〜1000bpであり、より好ましくはDNAフラグメントの大きさは約20bp〜500bpである。

【0129】あるいは、多数のニックを有する2本鎖核酸は、本発明の方法において使用され得ることもまた意図される。ニックは、2本鎖核酸の1本鎖における切れ目である。このようなニック間の距離は好ましくは5bp〜5kbであり、より好ましくは10bp〜1000bpの間である。

【0130】核酸フラグメントは多数の異なる方法により消化され得る。核酸フラグメントはヌクレアーゼ（例えば、DNアーゼIまたはRNアーゼ）を用いて消化され得る。核酸は、超音波処理方法によりまたは小穴を有するチューブの通過によりランダムに剪断され得る。

【0131】核酸が1つ以上の制限酵素を用いて部分的に消化され得、これにより特定の交差点が統計的に保持され得ることもまた意図される。

【0132】任意の1つの特定核酸フラグメントの濃度は、全核酸の1重量%より大きいことはなく、より好ましくは、任意の1つの特定核酸フラグメントの濃度は、

全核酸の0.1重量%より大きいことはない。

【0133】混合物中の異なる特定核酸フラグメントの数は少なくとも約100個であり、好ましくは少なくとも500個であり、そしてより好ましくは少なくとも約1000個である。

【0134】この工程で、1本鎖核酸フラグメントまたは2本鎖核酸フラグメントは、合成または天然のいずれかで、核酸フラグメントの混合物の不均一性を増加するために、ランダムな2本鎖核酸フラグメントに添加され得る。

【0135】2本鎖のランダムに切断された、またはニックを入れられた核酸フラグメントの集団が、この工程で混合され得るか、または組み合わせられ得ることがまた意図される。損傷したDNAは、鎖侵襲、組換え部位の形成に関連し得るニックの入った部位を介する組換えを増強するために利用され得、ハイブリッド形成のためなどの遊離の3'末端として作用し得る。

【0136】テンプレートポリヌクレオチドへの変異の挿入が所望される場合、テンプレートポリヌクレオチドに同一な領域およびテンプレートポリヌクレオチドに非相同な領域を有する1本鎖核酸フラグメントまたは2本鎖核酸フラグメントは、全核酸に比べて20重量倍過剰に、より好ましくは1本鎖核酸フラグメントが全核酸に比べて10重量倍過剰に添加され得る。

【0137】異なるが関連したテンプレートポリヌクレオチドの混合物が所望される場合、テンプレートのそれぞれに由来する核酸フラグメントの集団が約1:100未満の比率で組み合わせられ得、より好ましくは、比率は約1:40未満である。例えば、野生型ポリヌクレオチドと変異ポリヌクレオチドの集団との戻し交配が、中立変異（例えば、選択される表現型の特性において実質のない変化を生じる変異）を除去するために所望され得る。このような例では、ランダム消化変異ポリヌクレオチドフラグメントに添加され得るランダム消化野生型ポリヌクレオチドフラグメントの比率は、約1:1から約100:1であり、そしてより好ましくは1:1から40:1である。

【0138】ランダムな長さの核酸フラグメントの混合集団は、変性されて1本鎖核酸フラグメントを形成し、次いで再びアニールされる。他の1本鎖核酸フラグメントに相同な領域を有するこれらの1本鎖核酸フラグメントのみが、再びアニールされる。

【0139】ランダムな長さの核酸フラグメントは、熱を加えることにより変性される。当業者は完全に2本鎖核酸を変性するために必要な条件を決定し得る。好ましくは、温度は80℃～100℃であり、より好ましくは温度は90℃～96℃である。核酸フラグメントを変性するために使用され得る他の方法は、圧力（36）およびpHを包含する。

【0140】核酸フラグメントは冷却することにより再

びアニールされ得る。好ましくは、温度は20℃～75℃であり、より好ましくは温度は40℃～65℃である。高頻度の交差が平均して4つだけの連続した相同な塩基に基づいて必要とされる場合、組換えは低いアニール温度を使用することにより増強され得るが、プロセスはより困難になる。生じる再生の程度は、1本鎖核酸フラグメントの集団間の相同性の程度に依存する。

【0141】再生はポリエチレングリコール（「PEG」）または塩の添加により加速され得る。塩濃度は好ましくは0mM～400mMであり、より好ましくは塩濃度は10mM～100mMである。塩はKClまたはNaClであり得る。PEGの濃度は好ましくは0%～20%であり得、より好ましくは5%～10%であり得る。所望される場合は、より高い塩濃度および/またはPEGが使用され得る。

【0142】次に、アニールされた核酸フラグメントは、核酸ポリメラーゼおよびdNTP（すなわち、dATP、dCTP、dGTP、およびdTTP）の存在下でインキュベートされる。核酸ポリメラーゼは、Klenowフラグメント、Taqポリメラーゼ、または当該分野において知られる任意の他のDNAポリメラーゼであり得る。

【0143】再組立に使用されるアプローチは、それでもなお交差が生じるような最少の程度の相同性に依存する。同一である範囲が広い場合、Taqポリメラーゼが、45℃～65℃の間のアニール温度で使用され得る。同一である範囲が小さな場合、Klenowポリメラーゼが、20℃～30℃の間のアニール温度で使用され得る。当業者は達成される交差の数を増加するためにアニールの温度を変化させ得る。

【0144】ポリメラーゼはアニーリングの前、アニーリングと同時に、またはアニーリングの後に、ランダム核酸フラグメントに添加され得る。

【0145】ポリメラーゼの存在下での変性、再生、およびインキュベーションのサイクルは、本明細書では、核酸のシャッフリングまたは再組立を意味し得る。このサイクルは所望の回数繰り返される。好ましくは、サイクルは2回～50回繰り返され、より好ましくは配列は10回～40回繰り返される。用語「シャッフリング」は、PCR増幅または類似の増幅方法を含むがこれらに限定されない、広範な反復組換えプロセスを含む；従って、シャッフリングは、選択および/またはスクリーニングを有して反復して（すなわち、1より多いサイクルの配列組換えについて）使用される限りは、相同組換え、部位特異的組換え、キメラ形成（例えば、Levichkinら、上記）などを含み得る。非決定論的な組換え（例えば、一般的な相同組換え）が、決定論的な組換え（例えば、組換え部位が概知および/または規定されている場合、部位特異的組換え）と組み合わせ、またはその代わりに使用され得る。

【0146】得られる核酸は、約50bp～約100kbのより大きな2本鎖ポリヌクレオチドであり、好ましくはより大きなポリヌクレオチドは500bp～50kbである。

【0147】このより大きなポリヌクレオチドフラグメントは、テンプレートポリヌクレオチドと同じ大きさを有する核酸フラグメントの多くのコピーを直列して含有し得る。次いで、この鎖状フラグメントは、テンプレートポリヌクレオチドの単一コピーに消化される。結果は、テンプレートポリヌクレオチドとほぼ同じ大きさの核酸フラグメントの集団である。同一な範囲および非相同な範囲を有する1本鎖核酸フラグメントまたは2本鎖核酸フラグメントが、シャッフリングの前にテンプレートポリヌクレオチドに添加された場合、集団は混合集団である。あるいは、鎖状体が単量体化されることなく（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクションなどによって）直接導入され得る。大きな配列については、大きな配列が、実質的に類似する他の部分とともに別々にシャッフルされたいくつかのさらなる部分に部分されることが所望され得、次いで、生じたシャッフルされたさらなる部分のプールが、代表的にはもとの順番で連結され、次いで宿主細胞の形質転換などに使用され得るシャッフルされた大きな配列のプールを生じる。

【0148】次いで、これらのフラグメントは適切なベクターにクローニングされ、そして細菌を形質転換するためにライゲーション混合液が使用される。

【0149】単一の核酸フラグメントは、鎖状体の消化よりむしろ、PCR（米国特許第4,683,195号および4,683,202号）を含む種々の方法によりクローニングする前に単一の核酸フラグメントを増幅することにより、より大きな鎖状核酸フラグメントから得られ得ることが意図される。あるいは、鎖状体は単量体化されることなく（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクションなど）によって直接導入され得る。

【0150】クローニングに使用されるベクターは、ベクターが所望の大きさのDNAフラグメントを受容するのであれば決定的なものではない。DNAフラグメントの発現が所望される場合、クローニング媒体は、宿主細胞におけるDNAフラグメントの発現を可能にするように、DNAフラグメントの挿入部位の隣に転写シグナルおよび翻訳シグナルをさらに含有する。好ましいベクターは、プラスミドのpUC系列およびpBR系列を包含する。

【0151】得られる細菌集団は、ランダムな変異を有する多くの組換えDNAフラグメントを含む。この混合集団は、所望の組換え核酸フラグメントを同定するために試験され得る。選択の方法は所望のDNAフラグメントに依存する。

【0152】例えば、リガンドへの結合効率が増加したタンパク質をコードするDNAフラグメントが所望され

る場合、集団またはライブラリーにおいてそれぞれのDNAフラグメントにより発現されるタンパク質は、当該分野において公知の方法（すなわち、パンニング、親和性クロマトグラフィー）により、リガンドに結合するそれらの能力について試験され得る。薬物耐性が増加しているタンパク質をコードするDNAフラグメントが所望される場合、集団またはライブラリーにおいてそれぞれのDNAフラグメントにより発現されるタンパク質は、宿主生物に薬物耐性を与えるそれらの能力について試験され得る。当業者は、所望されるタンパク質がわかっているならば、タンパク質に所望の特性を与えるDNAフラグメントを同定するために、集団を容易に試験し得る。

【0153】当業者が、タンパク質のフラグメントがファージ表面上で融合タンパク質として発現されるようなファージディスプレイシステム（Pharmacia, Milwaukee WI）を使用し得ることが意図される。組換えDNA分子は、融合タンパク質（その一部分は組換えDNA分子によりコードされる）の転写を生じるような部位で、ファージDNAへクローニングされる。組換え核酸分子を含有するファージは、細胞内で複製および転写を受ける。融合タンパク質のリーダー配列は、融合タンパク質の輸送をファージ粒子の先端部へと導く。従って、組換えDNA分子により部分的にコードされる融合タンパク質は、上記の方法による検出および選択のために、ファージ粒子上にディスプレイされる。

【0154】核酸シャッフリングの多くのサイクルが、第1の集団のサブ集団からの核酸フラグメントを用いて実施され得ることがさらに意図され、このサブ集団は所望の組換えタンパク質をコードするDNAを含む。このようにして、さらに高い結合親和性または酵素活性を有するタンパク質が達成され得る。

【0155】核酸シャッフリングの多くのサイクルが、サブ集団から任意のサイレント変異を取り除くために、野生型核酸フラグメントと一回目またはそれに続く回の核酸シャッフリングに由来する核酸のサブ集団との混合物を用いて実施され得ることがまた意図される。

【0156】核酸の任意の供給源が、精製された形態で出発核酸として利用される。従って、プロセスはDNAまたはRNA（メッセンジャーRNAを含む）を使用し得、このDNAまたはRNAは、1本鎖または2本鎖であり得る。さらに、それぞれの片鎖を含むDNA-RNAのハイブリッドが使用され得る。核酸配列は、変異される核酸配列の大きさに依存して種々の長さであり得る。好ましくは、特定核酸配列は50～50000塩基対である。目的のタンパク質をコードする核酸を含有する完全なベクターが本発明の方法において使用され得ることが意図される。

【0157】核酸は任意の供給源、例えば、pBR322のようなプラスミドから、クローニングされたDNA

またはRNAから、または任意の供給源（細菌、酵母、ウイルスおよび植物または動物のような高等生物を含む）に由来する天然のDNAまたはRNAから得られ得る。DNAまたはRNAは、血液または組織材料から抽出され得る。テンプレートポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド連鎖反応（PCR）（米国特許第4,683,202号および4,683,195号）を使用する増幅により得られ得る。あるいは、ポリヌクレオチドは、細胞に存在するベクターに存在し得、そして十分な核酸が、当該分野で公知の方法により細胞を培養し、そして細胞から核酸を抽出することにより得られ得る。

【0158】任意の特定核酸配列が、本プロセスにより変異体の集団を生成するために使用され得る。特定核酸配列の変異配列の小さな集団が存在することまたは本プロセスの前に作製されることのみが必要とされる。

【0159】変異を有する特定核酸配列の初めの小さな集団が、多くの異なる方法により作製され得る。変異は誤りがちなPCRにより作製され得る。誤りがちなPCRは、長い配列にわたり、ランダムに低レベルで点変異を導入するために、低忠実度の重合条件を使用する。あるいは、オリゴヌクレオチド指定的変異誘発により、変異はテンプレートポリヌクレオチドに導入され得る。オリゴヌクレオチド指定的変異誘発の際に、ポリヌクレオチドの短い配列が、制限酵素消化を使用してポリヌクレオチドから除去され、そして種々の塩基が元の配列から変化した合成オリゴヌクレオチドで置き換えられる。ポリヌクレオチド配列はまた、化学変異誘発により変化させられ得る。化学変異原は、例えば、重亜硫酸ナトリウム、亜硝酸、ヒドロキシルアミン、ヒドラジン、またはギ酸を包含する。ヌクレオチド前駆体のアナログである他の薬剤は、ニトロソグアニジン、5-ブロモウラシル、2-アミノプリン、またはアクリジンを含む。一般的に、これらの薬剤はヌクレオチド前駆体の代わりにPCR反応に添加され、それにより配列を変異させる。プロフラビン、アクリフラビン、キナクリンなどのような挿入剤もまた使用され得る。ポリヌクレオチド配列のランダム変異誘発は、X線または紫外線光を用いる照射によっても達成され得る。一般に、そのように変異誘発されたプラスミドDNAフラグメントまたはDNAフラグメントは、E. coliへ導入され、そして変異のプラスミドのプールまたはライブラリーとして増殖させられる。

【0160】あるいは、特定核酸の小さな混合集団は、天然において見出され得る。なぜならそれらが同じ遺伝子の異なる対立遺伝子、または異なる関連種に由来する同じ遺伝子（すなわち、同族遺伝子）からなり得るからである。あるいは、特定核酸配列の小さな混合集団は、1つの種（例えば、免疫グロブリン遺伝子）内に見出される関連DNA配列であり得る。

【0161】一旦特定核酸配列の混合集団が生成された

ら、ポリヌクレオチドは、当業者に周知の技術を使用して、直接使用され得るかまたは適切なクローニングベクターに挿入され得る。

【0162】ベクターの選択はポリヌクレオチド配列の大きさ、および本発明の方法において使用される宿主細胞に依存する。本発明のテンプレートは、プラスミド、ファージ、コスミド、ファージミド、ウイルス（例えば、レトロウイルス、バリンフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス、レオウイルス、パラミキソウイルスなど）、またはその選択部分（例えば、コートタンパク質、スパイク糖タンパク質、キャプシドタンパク質）であり得る。例えば、変異される特定核酸配列がより大きい場合、コスミド、ファージミド、YAC、およびBACが好ましい。なぜなら、これらのベクターは大きな核酸フラグメントを安定に増殖し得るからである。

【0163】特定核酸配列の混合集団がベクターにクローニングされる場合、それぞれのベクターを宿主細胞に挿入し、そして宿主細胞にベクターを増殖させることにより、特定核酸配列の混合集団はクローン的に（clonally）増幅させられ得る。これはクローン増幅（clonal amplification）と呼ばれる。なぜなら、核酸配列の絶対数は増加するが、変異体の数は増加しないからである。

【0164】（平行PCR）平行PCRにおいて、PCR反応の多くの異なる反応が同じ容器内で平行して生じ、1つの反応の産物は別の反応の産物をプライムする。PCR産物が互いにプライムするので、平均的な産物の大きさはPCRサイクル数とともに増大する。

【0165】同時に複数のプライマーを用いることによって、50 kbより大きい配列が増幅され得る。全ての遺伝子および全てのプラスミドが、平行PCRによって合成オリゴヌクレオチドから一本のチューブ内で組み立てられ得る。配列は、ランダムなフラグメント化および相互のプライミングによるフラグメントの再組立によって、種々のレベルでランダムに変異し得る。部位特異的変異は、テンプレートのランダムなフラグメント化、続く変異誘発性オリゴヌクレオチドの存在下でのフラグメントの再組立によって長い配列へ導入され得る。平行PCRの部分的に有用な適用は、有性PCRと呼ばれる。

【0166】有性PCR（DNAシャッフリングとも呼ばれる）において、平行PCRはDNA配列のプール上でインビトロの組換えを行うために使用される。関連するが同一ではないDNA配列の混合物（代表的にはPCR産物、制限フラグメント、または全プラスミド）が、例えばDNAse I処理によってランダムにフラグメント化される。次いで、これらのランダムなフラグメントは平行PCRによって再度組立てられる。ランダムなフラグメントおよびそれらのPCR産物が互いにプライムするので、平均のフラグメントの大きさはPCRサイクル数とともに増大する。組換えまたは乗換え（cr

rossover) は、1つのテンプレート由来のDNAフラグメントが関連する異なるテンプレートの相同部位上でプライムする場合のような、テンプレートの交換によって生じる。例えば、有性PCRは異なる種由来の遺伝子のキメラのライブラリー(「ゾー(zoo)ライブラリー」)を構築するために使用され得る。有性PCRは、DNA配列のインビトロの進化のために有用である。有性PCRによって得られる新しい変異体組合せのライブラリーが、DNA、RNA、タンパク質、または低分子レベルで最適な組換え配列について選択される。組換え、選択、および増幅のこのプロセスは、所望の特性または機能を得るために必要なだけ多くのサイクル数で繰り返される。

【0167】平行PCRのほとんどの改変はプライマーを使用しない。DNAフラグメント(合成、ランダム消化によって得られた、またはプライマーを用いるPCRによるに関わらず)はテンプレートならびにプライマーとして役立つ。再組立反応におけるそれぞれの異なる末端配列濃度が非常に低いので、プライマーのダイマーの形成は観察されず、そして誤りがちなPCRが起こる場合、それは正しくアニールされた産物と同じ速度でのみ成長し得る。平行PCRは、アニールした対の半分のみが伸長可能な末端突出を有し、そして3'末端の濃度が低いので、多くのPCRサイクルを必要とする。

【0168】(有用性)本発明のDNAシャッフリング方法は、未知の配列のプールにおいて盲目的に実施され得る。再組立の混合オリゴヌクレオチド(再組立される配列に相同である末端を有する)に添加することにより、任意の配列混合物が任意の特定位置で別の配列混合物中に取り込まれ得る。従って、合成オリゴヌクレオチド、PCRフラグメント、または全遺伝子さえも混合物が、規定の位置で別の配列ライブラリーへ混合され得ることが意図される。1つの配列(混合物)の挿入は、テンプレートの別の部分での配列の挿入から独立している。従って、組換えの程度、要求される相同性の程度、およびライブラリーの多様性の程度は、再組立されるDNAの長さによって独立してまたは同時に変化され得る。

【0169】2つの遺伝子を混合するこのアプローチは、マウスハイブリドーマ由来の抗体をヒト化するために有用であり得る。2つの遺伝子を混合するアプローチまたは変異配列を遺伝子へ挿入するアプローチは、任意の治療学的に使用されるタンパク質(例えば、インターロイキンI、抗体、tPA、成長ホルモンなど)のために有用であり得る。このアプローチはまた、任意の核酸(例えば、プロモーター、またはイントロン、または遺伝子の3'非翻訳領域または5'非翻訳領域)において、発現を増加するためにまたはタンパク質の発現特性を変えるために有用であり得る。このアプローチはまた、リボザイムまたはアプタマー(aptamer)

を変異するためにもまた使用され得る。

【0170】シャッフリングは、多様な領域を分離する相同な領域の存在を必要とする。シャッフされる配列が実質的に同一ではない場合、イントロンに基づくシャッフリングおよび/または部位特異的組換えを使用することが代表的に好ましい。骨格様タンパク質構造は、特にシャッフリングに適し得る。保存される骨格は、自己会合により全体の折り畳みを決定するが、一方、特異的結合を媒介する相対的に制限されないループをディスプレイする。このような骨格の例は、免疫グロブリンβバレル、および4ヘリックス束である(24)。このシャッフリングは、結合について変異配列の種々の組み合わせで骨格様タンパク質を作製するために、使用され得る。

【0171】(インビトロにおけるシャッフリング)同等のいくつかの標準的な遺伝子交配もまた、インビトロにおけるシャッフリングにより実施され得る。例えば、「分子戻し交配」は、目的の変異について選択しながら、変異体の核酸と野生型核酸との混合を反復することにより実施され得る。従来の育種でのように、このアプローチは、異なる供給源に由来する表現型を選択のバックランドと組み合わせるために使用され得る。これは、例えば、選択されない特徴(すなわち、免疫原性)に影響する中立変異を除去するために有用である。従って、このアプローチは、タンパク質におけるどの変異が増強される生物学的活性に関与するか関与しないかを決定するために有用であり得、これは、誤りがちな変異誘発方法またはカセット変異誘発方法によっては達成され得ない利点である。

【0172】大きな機能的遺伝子は、小さなランダムフラグメントの混合物から正確に組立され得る。この反応は、化石の高度にフラグメント化されたDNAから遺伝子を再組立するために有用であり得る(25)。さらに、化石に由来するランダムな核酸フラグメントは、関連種に由来する類似遺伝子からの核酸フラグメントとともに組み合わせられ得る。

【0173】本発明の方法は、種々の研究および診断的適用に必要とされるように、単一の細胞から全ゲノムを、インビトロにおいて増幅するために使用し得ることが意図される。PCRによるDNA増幅は、実際、約40kbの長さに制限される。PCRによりE.coli(5,000kb)のような全ゲノムを増幅することは、125個の40kbのフラグメントを生じる約250のプライマーを必要とする。このアプローチは、十分な配列データが利用できないために実用的ではない。一方で、DNアーゼIを用いるゲノムのランダムな消化、それに続く小フラグメントのゲル精製は、多数の可能なプライマーを提供する。PCR反応においてこのランダム小フラグメントのこの混合物をプライマーとして単独でまたはテンプレートとしての全ゲノムと共に使用する

と、ゲノムの多くのコピーを含む単一の鎖状体の理論上の終点とともに逆鎖反応が生じるはずである（希釈およびさらなるPCRと想定される）。

【0174】ランダムフラグメントのみが使用される場合、コピー数において100倍の増幅および50kbより大きい平均フラグメントサイズが得られ得る（実施例2を参照のこと）。より大きな鎖状体が、多くの小フラグメントの重複により生成されたと考えられる。合成プライマーを使用して得られる特定PCR産物の質は、増幅されないDNAから得られる産物と区別できない。このアプローチはゲノムのマッピングに有用であると期待される。

【0175】シャッフルされるポリヌクレオチドは、実施者の判断で、ランダムにまたは非ランダムにフラグメント化され得る。

【0176】（インビボにおけるシャッフリング）インビボでのシャッフリングの1つの実施態様において、特定核酸配列の混合された集団は、各宿主細胞において少なくとも2つの異なる核酸配列が存在する条件下で、細菌細胞（例えば、*Archeae bacteria*）または真核生物細胞へ導入される。フラグメントは種々の異なる方法により、宿主細胞へ導入され得る。宿主細胞は、当業者に公知の方法（例えば、塩化カルシウムでの処理）を使用してフラグメントで形質転換され得る。フラグメントがファージゲノムに挿入される場合、宿主細胞は特定核酸配列を有する組換えファージゲノムを用いてトランスフェクトされ得る。あるいは、核酸配列は、エレクトロポレーション、本来の能力、形質導入、トランスフェクション、リポフェクション、バイオリスティック（*biolistic*）、接合など、または細胞へポリヌクレオチド配列を導入する他の適切な方法を用いて、宿主細胞へ導入され得る。

【0177】一般的に、この実施態様において、特定核酸配列は、宿主細胞において配列を安定に複製し得るベクター中に存在する。さらに、ベクターを有する宿主細胞が選択またはスクリーニングされ得るように、ベクターがマーカー遺伝子をコードすることが意図される。このことは、変異特定核酸配列が、宿主細胞へ導入された後に回収され得ることを確実にする。しかし、特定核酸配列の混合集団全体がベクター配列上に存在する必要がないことが意図される。むしろ、宿主細胞へのフラグメントの導入後に、各宿主細胞がそこに存在する関連配列核酸配列の少なくとも1つを有する2つのベクター種を含有することを確実にするためには、十分な数だけの配列がベクターにクローニングされればよい。特定核酸配列の集団のサブセットをベクターへクローニングさせるよりも、このサブセットは宿主細胞にすでに安定に組み込まれているかもしれないこともまた、意図される。

【0178】同一の領域を有する2つのフラグメントが宿主細胞へ挿入される場合、2つのフラグメント間に相

同組換えが生じることが見出されている。2つの変異した特定の核酸配列間でのこのような組換えは、変異体の全てまたはほとんどの、実質的に全ての組合せ組換え体の産生を生じる（ライブラリーの大きさ、および伝達効率などによって制限される）。

【0179】変異特定核酸配列のいくつかが直鎖上の核酸分子上に存在する場合、組換えの頻度が増加することにもまた見出されている。従って、好ましい実施態様では、特定核酸配列のいくつかが直鎖状核酸フラグメント上に存在する。1つの実施態様において、核酸分子は、非相同配列を含んでいるかもしれないし含んでいないかもしれない1本鎖ファージゲノムのような、1本鎖または実質的に1本鎖である。M13ファージは、適切なssDNAテンプレートの一例であり、そしてM13は、M13ウイルスが原核生物細胞（例えば、*E. coli*）内でシャッフルされ得、次いで哺乳動物細胞へDNAを転移するために使用され得る利点を有する。

【0180】形質転換の後に、宿主細胞形質転換体は、所望の特質を有する変異特定核酸配列を含有する宿主細胞形質転換体を同定するための選択下におかれる。例えば、特定の薬物に対する耐性の増加が所望される場合、形質転換された宿主細胞は、特定の薬物の濃度の増加を受け得、そして薬物耐性を増加させ得る変異タンパク質を産生する形質転換体が、選択され得る。特定のタンパク質がレセプターに結合する能力の増強が所望される場合、タンパク質の発現は形質転換体から誘導され得、そして得られるタンパク質は当業者に公知の方法によるリガンド結合アッセイにおいてアッセイされ、リガンドに対する結合の増強を示す変異集団のサブセットを同定する。あるいは、タンパク質は、適切なプロセッシングを確実にするように、別のシステムにおいて発現され得る。

【0181】一旦、所望の特徴を有する第1の組換え特定核酸配列（娘配列）のサブセットが同定されると、次いで、それらは2回目の組換えに供される。

【0182】組換えの2回目のサイクルにおいて、組換え特定核酸配列は、元の変異特定核酸配列（親配列）と混合され得、そして上記のようにサイクルが反復され得る。この方法では、特性が増強されているかまたは特性が増強されているタンパク質をコードする第2の組換え特定核酸配列のセットが同定され得る。このサイクルは所望される多数回反復され得る。

【0183】第2のまたはそれに続く組換えサイクルにおいて、戻し交配が実施され得ることもまた意図される。分子の戻し交配は、所望の特定核酸配列を多数の野生型配列と混合することにより実施され得、それにより少なくとも1つの野生型核酸配列および変異核酸配列が、形質転換後に、同じ宿主細胞中に存在する。野生型特定核酸配列を用いる組換えは、免疫原性のような選択されない特徴に影響し得るが、選択される特徴には影響し得ないそれらの中立変異または寄与の弱い変異を除去

する。

【0184】本発明の別の実施態様において、一回目の間、宿主細胞へ導入する前に、特定核酸配列のサブセットがフラグメント化され得ることが意図される。フラグメントの大きさは、他の配列との相同組換えのために、他の配列に同一ないくつかの領域を含むのに十分な大きさでなくてはならない。これらのフラグメント、ssDNA、またはdsDNAは、インビトロでRecAでコートされて、宿主DNAへのハイブリダイゼーションおよび/または組み込みを促進し得る。フラグメントの大きさは0.03kb~100kbの範囲であり、より好ましくは0.2kb~10kbの範囲である。それに次の回において、前の回で選択された配列以外の全ての特定核酸配列は、宿主細胞へ導入する前にフラグメントに切断され得ることもまた意図される。「切断」は、ヌクレアーゼ消化、PCR増幅（部分的伸長、もしくはスタックリングによる）、または親配列（単数または複数）の部分的な長さのポリヌクレオチドを生成するための他の適切な手段により得る。

【0185】配列のフラグメント化は、当該分野において公知の種々の方法により達成され得る。配列は、核酸配列中で、ランダムにフラグメント化され得るか、または特定部位でフラグメント化され得る。ランダムフラグメントは、核酸の切断により、または核酸を過酷な物理的処理（例えば、剪断または放射線照射）または過酷な化学剤（例えば、遊離ラジカル；金属イオン；脱プリンおよび切断のための酸処理による）に核酸を曝露することにより得られ得る。DNAの場合、DNaseもしくは同様のヌクレアーゼを使用することによって、または本明細書中に考察される他の手段によってもまた、ランダムフラグメントが得られ得る。配列は、制限酵素の使用により、特定部位で切断され得る。フラグメント化配列は、1本鎖または2本鎖であり得る。配列がもともと1本鎖である場合、宿主細胞に挿入する前に、それらは熱、化学物質、または酵素で変性され得る。核酸の鎖を分離するのに適切な反応条件は、当該分野において周知である。さらに、部分的なPCR伸長、PCRスタックリング、および親配列の部分的な長さのコピーを産生するための他の関連する方法が、「フラグメント化」を効果的にするために（例えば、異なる親配列由来のセグメントを含むハイブリッド産物を得るために）使用され得る。

【0186】このプロセスの工程は、無限に反復され得、達成され得る可能な変異体の数によってのみ制限される。一定の数のサイクル後、全ての可能な変異体が達成され、そしてさらなるサイクルは余分になる。

【0187】1つの実施態様において、同じ変異したテンプレート核酸が繰り返し組換えられて、そして得られる組換え体が所望の特徴について選択される。

【0188】従って、変異したテンプレート核酸の初め

のプールまたは集団は、E. coliのような細菌において複製可能なベクターへクローニングされる。E. coliにおいて自律複製し得るかまたは宿主染色体に組み込まれ得るかぎり、特定のベクターは必須ではない。好ましい実施態様において、ベクターは、ベクターに連結される変異特定核酸によりコードされる任意のタンパク質の発現および生成を可能にするように設計される。ベクターが選択マーカーをコードする遺伝子を含むすることもまた、好ましい。

【0189】変異核酸配列のプールを含むベクターの集団は、E. coli宿主細胞へ導入される。ベクターの核酸配列は、形質転換、トランスフェクション、またはファージの場合は感染により導入され得る。細菌を形質転換するために使用されるベクターの濃度は、多くのベクターが各細胞へ導入され得る程度である。一旦細胞中に存在すると、相同組換えの効率は、相同組換えが種々のベクター間で生じる程度である。このことにより、元の親変異配列と異なる変異の組み合わせを有する変異体（娘）が生成する。

【0190】次いで、宿主細胞は代表的にはクローン的に複製されそして、ベクター上に存在するマーカー遺伝子について選択される。プラスミドを有するこれらの細胞のみが、選択下で増殖する。

【0191】次いで、ベクターを含む宿主細胞は、好ましい変異の存在について試験される。このような試験は、例えば、選択される遺伝子が改善される薬物耐性遺伝子である場合、細胞を選択圧下におくことからなり得る。ベクターが変異核酸配列によりコードされるタンパク質の発現を可能にする場合、このような選択により、このようにコードされるタンパク質の発現、タンパク質の単離、および、例えば、効率の増大を伴って目的のリガンドに結合するかどうかを決定するためのタンパク質の試験を可能にすることを包含し得る。

【0192】一旦、所望の特徴を与える娘変異核酸配列の特定のプールが同定されると、核酸は、すでにベクターに連結されているかまたはベクターから分離されているかのいずれかで単離される。次いで、この核酸は、それ自身と、または類似の選択されたプールと組み換えられ、そしてサイクルが繰り返される；必要に応じて、親配列は、他の選択される娘種の代わりまたはそれに加えて、組換えの次の回に使用され得る。

【0193】本方法により、所望の特性が増強された核酸配列が選択され得ることが示されている。

【0194】別の実施態様において、変異体の第一世代は細胞内に保持され、そして変異配列の第一世代が再び細胞に添加される。従って、実施態様Iの一回目のサイクルは上記のように実施される。しかし、娘核酸配列が同定された後、これらの配列を含む宿主細胞が保持される。

【0195】娘の変異特定核酸集団は、フラグメントと

してまたは同じベクターへクローニングされるかのいずれかで、既に娘核酸を含む宿主細胞へ導入される。組換えを細胞において生じさせ、次世代の組換え体、または孫娘が上記の方法により選択される。

【0196】このサイクルは、所望の特徴を有する核酸またはペプチドが得られるまで、多数回反復され得る。続くサイクルにおいて、好ましい変異体に添加される変異配列の集団が、親変異体または任意の次の世代から生じ得ることが意図される。

【0197】別の実施態様において、本発明は、任意の中立変異を除去するために、得られる組換え特定核酸（1種または数種のプール）の「分子」戻し交配を実施する方法を提供する。中立変異は、核酸またはペプチドに所望の特性を与えない変異である。しかし、このような変異は、核酸またはペプチドに所望でない特徴を与えるかもしれない。従って、このような中立変異を除去することが望ましい。本発明の方法は、そのように行う手段を提供する。

【0198】この実施態様において、所望の特徴を有する変異体核酸が実施態様の方法により得られた後、核酸、核酸を有するベクター、またはベクターおよび核酸を含有する宿主細胞、組織、もしくは個々の器官が単離される。

【0199】次いで、核酸またはベクターは、かなり過剰な野生型核酸とともに宿主細胞へ導入される。変異体の核酸および野生型配列の核酸を、組換えに供する。得られる組換え体は、変異体核酸と同じ選択下に置かれる。所望の特徴を保持している組換え体のみが選択される。所望の特徴を与えない任意のサイレント変異は、野生型DNAとの組換えによって失われる。このサイクルは、全てのサイレント変異が除去されるまで、多数回反復され得る。

【0200】従って、本発明の方法は、分子戻し交配において、不必要な変異、寄与の弱い変異、またはサイレント変異を除去するために使用され得る。

【0201】（有用性）本発明のインビボ組換え方法は、特定核酸フラグメントもしくは配列の未知の変異体または対立遺伝子のプール、または反復組換えに適切な、多様であるが関連する配列もしくは1つ以上の組換え配列（例えば、部位特異的組換え部位、相同組換えのために実質的な同一性を有する配列相同性の局在セグメント、相同組換え「ホットスポット」配列、制限部位など）を共有する配列のファミリーについて、盲目的に実施され得る。しかし、特定核酸フラグメントの実際のDNAまたはRNA配列を知る必要はない。

【0202】遺伝子の混合集団内で組換えを使用するアプローチは、任意の有用なタンパク質（例えば、インターロイキンI、抗体、tPA、成長ホルモンなど）を生成するために有用であり得る。本アプローチは、特異性または活性が変えられているタンパク質を生成するため

に使用され得る。本アプローチはまた、変異体核酸配列（例えば、プロモーター領域、イントロン、エキソン、エンハンサー配列、遺伝子の3' 非翻訳領域または5' 非翻訳領域）を生成するために有用であり得る。従って、本アプローチは、発現率が増加されている遺伝子を生成するために使用され得る。本アプローチはまた、反復性DNA配列の研究においても有用であり得る。最後に、本アプローチは、リボザイムまたはアプタマーを変異させるのに有用であり得る。タンパク質における多様性の領域を分離する骨格様領域は、本発明の方法に特に適切であり得る。保存された骨格は、自己結合により全体の折り畳みを決定するが、一方、特異的結合を媒介する比較的制限されていないループをディスプレイする。このような骨格の例は、免疫グロブリンβバレル、および4ヘリックス束である。本発明の方法は、結合について変異配列の種々の組み合わせで骨格様タンパク質を作製するために使用され得る。

【0203】いくつかの標準的な遺伝交配の等価物がまた、本発明の方法により実施され得る。例えば、「分子」戻し交配は、目的の変異を選択しながら、変異体の核酸を野生型の核酸と繰り返し混合することにより実施され得る。従来の育種におけるように、本アプローチは異なる供給源に由来する表現型をバックグラウンドの選択へ組み合わせるために使用され得る。本アプローチでは、例えば、選択されない特徴（例えば、免疫原性）に影響する中立変異を除去するために有用である。従って、本アプローチは、タンパク質のどの変異が生物学的活性の増強に関与するか、およびどの変異が関与しないかを決定するために有用であり得る。

【0204】（ペプチドディスプレイ法）本方法は、開示された方法のいずれかによるインビトロおよび/またはインビボ組換えにより、および任意の組み合わせで、ペプチドディスプレイ法により選択されるポリヌクレオチド配列をシャッフリングするために使用され得、ここでは、会合されたポリヌクレオチドは、表現型について（例えば、予め決定されたレセプター（リガンド）に対する親和性について）スクリーニングされるディスプレイされたペプチドをコードする。

【0205】生物薬剤の開発および分子生物学の増々重要な局面は、生体高分子と相互作用するペプチドまたはペプチド疑似体のペプチド構造（アミノ酸一次配列を包含する）の同定である。所望の構造または所望の機能的特性（例えば、予め決定された生体高分子（例えば、レセプター）に対する結合）を有するペプチドを同定する1つの方法は、ペプチドのアミノ酸配列により与えられる所望の構造または所望の機能的特性を有する個々のライブラリーメンバーについて、大規模なライブラリーまたはペプチドをスクリーニングすることを包含する。

【0206】ペプチドライブラリーを生成する直接的な化学合成方法に加えて、いくつかのDNA組換え方法も

また報告されている。1つの型は、バクテリオファージ粒子または細胞表面上のペプチド配列、抗体、または他のタンパク質のディスプレイを包含する。一般に、これらの方法において、それぞれのバクテリオファージ粒子または細胞は、天然のバクテリオファージまたは細胞のタンパク質配列に加えて、ディスプレイされたペプチドの単一種をディスプレイする個々のライブラリーメンバーとして役立つ。各バクテリオファージまたは細胞は、特定のディスプレイされたペプチドの配列をコードするヌクレオチド配列情報を含有する；従って、ディスプレイされたペプチド配列は、単離されたライブラリーメンバーのヌクレオチド配列決定により確かめられ得る。

【0207】周知のペプチドディスプレイ方法は、フィラメント様バクテリオファージの表面上でのペプチド配列（代表的には、バクテリオファージコートタンパク質との融合物として）の提示を包含する。バクテリオファージライブラリーは固定した予め決定された高分子または小分子（例えば、レセプター）とともにインキュベートされ得、それにより固定高分子に結合するペプチド配列を提示するバクテリオファージ粒子が、予め決定された高分子に結合するペプチド配列を提示しないバクテリオファージ粒子と差別的に区分され得る。次いで、固定高分子に結合するバクテリオファージ粒子（すなわち、ライブラリーメンバー）は回収され、そして次の回の親和性増強およびファージ複製のために、複製されて、選択されたバクテリオファージサブ集団を増幅する。数回の親和性増強およびファージ複製の後、このように選択されたバクテリオファージライブラリーメンバーは単離され、そしてディスプレイされたペプチド配列をコードするヌクレオチド配列が決定され、これにより予め決定された高分子（例えば、レセプター）に結合するペプチドの配列（単数または複数）が同定される。このような方法はPCT特許公開第91/17271号、同91/18980号、および同91/19818号、ならびに93/08278号においてさらに記載されている。

【0208】後者のPCT公開は、ペプチドリガンドのディスプレイのための組換えDNA方法を記載している。この方法は、融合タンパク質のライブラリーの生成を包含するが、この融合タンパク質の各々は、予め決定された高分子に結合する可能性を利用し得る第1のポリペプチド部分（代表的には可変配列を含む）、およびDNAに結合する第2のポリペプチド部分（例えば、個々の融合タンパク質をコードするDNAベクター）で構成されている。形質転換された宿主細胞が融合タンパク質の発現を可能にする条件下で培養される場合、融合タンパク質はそれをコードするDNAベクターに結合する。宿主細胞の溶解の際に、融合タンパク質/ベクターDNA複合体は、バクテリオファージ粒子がファージに基づくディスプレイシステムにおいてスクリーニングされるのとはほぼ同様にして、予め決定された高分子に対してス

クリーニングされ得、選択された融合タンパク質/ベクターDNA複合体におけるDNAベクターの複製および配列決定が、選択されたライブラリーペプチド配列（単数または複数）の同定のための基礎として役立つ。

【0209】ペプチドおよび同様のポリマーのライブラリーを生成する他のシステムは、組換え方法およびインビトロ化学合成方法の両方の局面を有する。これらのハイブリッド方法において、無細胞酵素機構がライブラリーメンバー（すなわち、ペプチドまたはポリヌクレオチド）のインビトロ合成を達成するために使用される。1つの型の方法において、予め決定されたタンパク質または予め決定された色素分子に結合する能力を有するRNA分子が、選択およびPCR増幅を交互に行うことにより選択された（TuerkおよびGold（1990）*Science* 249:505; EllingtonおよびSzostak（1990）*Nature* 346:818）。同様の技術が、予め決定されたヒト転写因子を結合するDNA配列を同定するために使用された（ThiesenおよびBach（1990）*Nucleic Acids Res.* 18:3203; BeaudryおよびJoyce（1992）*Science* 257:635; PCT特許公開第92/05258号および第92/14843号）。

同様の様式において、インビトロ翻訳の技術が目的のタンパク質を合成するために使用され、そしてペプチドの大規模なライブラリーを生成するための方法として提案されてきた。一般に安定化されたポリソーム複合体を含有するインビトロ翻訳に依存するこれらの方法は、PCT特許公開第88/08453号、第90/05785号、第90/07003号、第91/02076号、91/05058号、および92/02536号にさらに記載されている。出願人らは、ライブラリーメンバーが、DNA結合活性を有する第1のポリペプチド部分およびライブラリーメンバーの独特のペプチド配列を有する第2のポリペプチド部分を有する、融合タンパク質を含む方法を記載する；このような方法は、無細胞インビトロ選択形式における使用に、特に適切である。

【0210】この方法の改変は、イントロンに基づく組換えによって行われる反復配列組換えである。ここで、組換えられる配列はエキソンとして（例えば、天然に存在するかまたは人工的であるかに関わらず、エキソンの形態で）存在し、これは配列同一性をほとんど共有しないかまたは共有せず、そしてこれは、イントロン間の相同組換えを支持するに十分な配列同一性を共有する1つ以上のイントロン（これは天然に存在するイントロン様配列であり得るか、またはそうでなくても良い）によって分けられている。例えば、限定されないが、ポリヌクレオチドの集団は、各ライブラリーのメンバーが、イントロンの第一のセットを介してエキソンの第2のセット（これは、イントロンの第2のセットを介してエキソン

の第3のセットのコピーの1つ以上に連結されている)のコピーの1つ以上に連結されている、エキソンの第1のセットのコピーの1つ以上を有するライブラリーのメンバーを含む。エキソンの第1のセットの各メンバーは、互いに、またはエキソンの第2もしくは第3のセットのメンバーと実質的配列同一性をほとんど共有しないか、または共有しなくてもよい。同様に、エキソンの第2のセットの各メンバーは、互いに、またはエキソンの第1もしくは第3のセットのメンバーと実質的に配列同一性をほとんど共有しないか、または共有しなくてもよい。同様に、エキソンの第3のセットの各メンバーは、互いに、またはエキソンの第1もしくは第2のセットと実質的に配列同一性をほとんど共有しないか、または共有しなくてもよい。イントロンの各セット(第1、第2、第3など)の各メンバーは、同一のイントロンのセットのメンバー間での組換え(制限部位媒介性組換えを含む、相同組換えまたは部位特異的組換え)を支持するために、セットの他のメンバーと十分な配列同一性を共有するが、代表的には、他のイントロンのセット(例えば、第2または第3のセット)のメンバーとは共有せず、その結果、ライブラリーのメンバーのイントロンのセット内組換えが生じ、そして組み換えられたライブラリーのメンバーのプールが生成され、ここで、エキソンの第1のセット、エキソンの第2のセット、およびエキソンの第3のセットが互いに効果的にシャッフルされる。

【0211】ディスプレイされたペプチド配列は、代表的には3~5000アミノ酸以上、頻繁には5~100アミノ酸、そしてしばしば約8~15アミノ酸の種々の長さであり得る。ライブラリーは、ディスプレイされたペプチド配列の種々の長さを有するライブラリーメンバーを含有し得るか、またはディスプレイされたペプチド配列の固定した長さを有するライブラリーメンバーを含有し得る。ディスプレイされたペプチド配列(1つまたは複数)の1部分または全ては、ランダムな配列、疑似ランダムな配列、規定の核セットの配列、固定した配列などであり得る。本ディスプレイ方法は、ポリソーム上の新生scFvまたはファージ上に表示されたscFvのような単鎖抗体のインビトロおよびインビボにおけるディスプレイの方法を包含し、広い多様性の可変領域配列および結合特異性を有するscFvライブラリーを、大規模なスケールでのスクリーニングを可能にする。

【0212】本発明はまた、ランダムな配列、疑似ランダムな配列、および規定の配列のフレームワークペプチドライブラリーを提供し、そして目的のレセプター分子またはエピトープ、またはペプチドを改変する遺伝子産物、またはRNAに所望の様式で結合する有用な化合物(例えば、単鎖抗体を含むペプチド)を同定するために、それらのライブラリーを生成しそしてスクリーニングする方法を提供する。ランダムな配列、疑似ランダム

な配列、および規定の配列のフレームワークペプチドは、ディスプレイされたペプチド、またはディスプレイされたペプチドが合成されたポリヌクレオチドのテンプレートに付着したディスプレイされた単鎖抗体を含むペプチドライブラリーメンバーのライブラリーから生成される。付着の様式は、選択された本発明の特定の実施態様に従って変化し得、そしてファージ粒子におけるキャプシドの包みこみ、または細胞における取り込みを包含し得る。

【0213】親和性増強方法は、ペプチドおよび単鎖抗体のかなり大規模なライブラリーがスクリーニングされ、そして所望のペプチド(1つまたは複数)または単鎖抗体をコードするポリヌクレオチド配列が選択されることを可能にする。次いで、ポリヌクレオチドのプールは単離およびシャッフルされ得、選択されるペプチド(1つまたは複数)の(またはその予め決定された部分)または単鎖抗体(または、ちょうどそのV_H、V_L、またはCDR部分)のアミノ酸配列を組み合わせる。これらの方法を使用して、ペプチドまたは単鎖抗体を分子について所望の結合親和性を有するとして同定し得、そして所望の高親和性ペプチドまたはscFvに迅速に集めるためにシャッフルのプロセスを活用し得る。次いで、ペプチドまたは抗体は、任意の適切な使用(例えば、治療剤または診断剤として)のために、従来の手段により大量に合成され得る。

【0214】本発明の有意な利点は、予想されるリガンド構造に関する情報が目的のペプチドリガンドまたは抗体を単離するためには事前に全く要求されないことである。同定されたペプチドは、生物学的活性を有し得、このことは選択されたレセプター分子に対する特異的な結合親和性を少なくとも含むことを意味し、そして、いくつかの例において、他の化合物の結合をブロックする能力、代謝経路を刺激または阻害する能力、シグナルまたはメッセンジャーとして作用する能力、細胞活性を刺激または阻害する能力などをさらに包含する。

【0215】本発明はまた、予め決定されたレセプター(例えば、哺乳動物タンパク質性レセプター(例えば、ペプチド性ホルモンレセプター、細胞表面レセプター、他のタンパク質(1つまたは複数)に結合してヘテロダイマーのような細胞内タンパク質複合体を形成する細胞内タンパク質など)、またはエピトープ(例えば、固定タンパク質、糖タンパク質、多糖など)に結合するライブラリーメンバーについて、新生ペプチド(単鎖抗体を包含する)をディスプレイするポリソームのライブラリーを親和性スクリーニングすることにより選択されたポリヌクレオチド配列のプールをシャッフルする方法もまた提供する。

【0216】これらの方法のいずれかにより、一回目の選択(代表的には、レセプター(例えば、リガンド)への結合についての親和性選択による)において選択され

たポリヌクレオチド配列は、プールされ、そしてプール（単数または複数）はインビトロおよび／またはインビボにおける組換えによりシャッフリングされ、選択された組換えポリヌクレオチド配列の集団を含むシャッフリングプールを生成する。選択された組換えポリヌクレオチド配列は、少なくとも1回の続く選択に供される。次の回の選択（1回または複数回）において選択されたポリヌクレオチド配列（プールまたは個々のクローンで）は、直接用いられ得、配列決定され得、そして／または、1回以上のさらなるシャッフリングおよびそれに続く選択に供され得る。選択された配列はまた、中立配列（すなわち、結合に対して非実質的な機能的効果を有する）をコードするポリヌクレオチド配列と戻し交配され（例えば、選択された配列に実質的に同一な野生型または天然に存在する配列と戻し交配することによる）、免疫原性の低い天然様の機能的ペプチドを生成し得る。一般に、戻し交配の間、続く選択は、予め決定されたレセプター（リガンド）への結合の特性を保持するように適用される。他の特性が、特に、予め決定された結合相互作用をブロックする（例えば、部分的なまたは完全なアンタゴニストまたは競合結合種として作用する）能力、または触媒機能を示す能力、などによって例示される。

【0217】選択配列のシャッフリングの前または同時に、配列が変異誘発され得る。1つの実施態様において、選択されるライブラリーメンバーは、原核生物ベクター（例えば、プラスミド、ファージミド、またはバクテリオファージ）中にクローニングされ、ここでは、別個のライブラリーメンバーを提示する個々のコロニー（またはブラーク）の集合が生成される。次いで、選択される個々のライブラリーメンバーは操作され（例えば、部位特異的変異誘発、カセット変異誘発、化学変異誘発、PCR変異誘発など）、選択されるライブラリーメンバーの配列に基づいて配列の多様性の核（kernel）を提示するライブラリーメンバーの集合を生成し得る。選択される個々のライブラリーメンバーまたはプールの配列は操作され、ランダム変異、疑似ランダムな変異、規定の核変異（すなわち、可変残基位置および不変残基位置を含み、そして／またはアミノ酸残基の規定のサブセットから選択される残基を含み得る可変残基位置を含む）、コドンに基づく変異などを、選択される個々のライブラリーメンバー配列にセグメント的にまたは全長にわたってのいずれかで、組み込み得る。変異誘発された選択ライブラリーメンバーは、次いで、本明細書で記載されるインビトロおよび／またはインビボにおける組換えシャッフリングにより、シャッフリングされる。

【0218】本発明はまた、本発明の複数の個々のライブラリーメンバーを含むペプチドライブラリーを提供し、ここでは（1）上記複数のうち各個々のライブラリーメンバーが、選択される配列のプールのシャッフリン

グにより生成される配列を含有し、そして（2）各個々のライブラリーメンバーは、可変ペプチドセグメント配列または単鎖抗体セグメント配列（これは、上記複数における他の個々のライブラリーメンバーの可変ペプチドセグメント配列または単鎖抗体配列から区別される）を含有する（しかし、いくつかのライブラリーメンバーは、不均一な増幅、推計学的確率などのために、ライブラリー当たり1コピー以上で存在し得る）。

【0219】本発明はまた、その方法によって作られるもの（product-by-process）を提供する。ここでは、予め決定された結合特異性を有する（または予め決定された結合特異性を有するペプチドをコードする）選択されたポリヌクレオチド配列が、以下の工程により形成される：（1）ディスプレイペプチドまたはディスプレイ単鎖抗体のライブラリーを予め決定されたレセプター（例えば、リガンド）またはエビトープ（例えば、抗原高分子）に対してスクリーニングし、そして予め決定されたレセプターまたはエビトープに結合するライブラリーメンバーを同定および／または濃縮し、選択されたライブラリーメンバーのプールを生成する工程、（2）予め決定されたエビトープを結合して、そしてそれによりライブラリーから単離および／または濃縮されてシャッフリングライブラリーを生成する選択されたライブラリーメンバー（または増幅またはクローニングされたそのコピー）を、組換えによりシャッフリングする工程、および（3）シャッフリングライブラリーを予め決定されたレセプター（例えば、リガンド）またはエビトープ（例えば、抗原高分子）に対してスクリーニングし、そして予め決定されたレセプターまたはエビトープに結合するシャッフリングライブラリーメンバーを同定および／または濃縮し、選択されたシャッフリングライブラリーメンバーのプールを生成する工程。

【0220】（抗体ディスプレイおよびスクリーニング法）本発明の方法は、開示された方法のいずれかによるインビトロおよび／またはインビボ組換えおよび任意の組み合わせにより、抗体ディスプレイ法により選択されたポリヌクレオチド配列をシャッフリングするために用いられ得る。ここで会合されたポリヌクレオチドは、表現型（例えば、予め決定された抗原（リガンド）への結合についての親和性）についてスクリーニングされたディスプレイされた抗体をコードする。

【0221】種々の分子遺伝学的アプローチが、免疫グロブリン鎖中に存在し得る非常に多数の異なる可変領域により表される広大な免疫学的レパートリーを捕獲するために考案されている。天然に存在する生殖系列免疫グロブリン重鎖座位は、多様性（D）セグメント遺伝子の直列の配列の上流に位置する可変性（V）セグメント遺伝子の分離した直列の配列からなる。このDセグメント自身は、結合（J）領域遺伝子の直列の配列の上流に位置し、J領域は、定常（C_H）領域遺伝子の直列に位置

する。Bリンパ球の発達の間、V-D-J再配列が生じ、ここで重鎖可変領域遺伝子 (V_H) は、融合したD-Jセグメントを形成するための再配列、それに続くV-D-J結合産物遺伝子を形成するためのVセグメントとの再配列により形成され、生産的に再配列される場合、このV-D-J結合産物遺伝子は、機能的な重鎖の可変領域 (V_H) をコードする。同様に、軽鎖座位は、いくつかのJセグメントの1つといくつかのVセグメントの1つを再配列し、軽鎖の可変領域 (V_L) をコードする遺伝子を形成する。

【0222】免疫グロブリン中にあり得る可変領域の広範なレパートリーは、B細胞発達における再配列の間のVセグメントとJセグメント(とDセグメント(重鎖座位である場合))との結合の多数の組み合わせの可能性に部分的に由来する。重鎖可変領域における付加的な配列多様性は、V-D-J結合の間のDセグメントの不均一な再配列、およびN領域付加から生じる。さらに、特定のB細胞クローンの抗原選択は、重鎖と軽鎖の可変領域のいずれか1つまたは両方に非生殖系列変異を有する変異体をより高い親和性に関して選択する；この現象は、「親和性成熟」または「親和性鋭敏化 (sharpening)」と呼ばれる。代表的には、これらの「親和性鋭敏化」変異は、可変領域の特定の範囲に、最も一般的には相補性決定領域 (CDR) 中にクラスター形成する。

【0223】抗原刺激B細胞の発達(すなわち、免疫化)を通して高親和性免疫グロブリンを産生および同定することにおける多くの制限を克服するために、特異的な抗原に対する高親和性抗体についてスクリーニングされ得る組み合わせの抗体ライブラリーを作製するように操作され得る種々の原核生物の発現システムが開発されている。Escherichia coliおよびバクテリオファージシステムにおける抗体の発現における最近の利点(以下の「別のペプチドディスプレイ法」を参照のこと)は、実際に任意の特異性が、特徴づけられたハイブリドーマから抗体遺伝子をクローニングするか、または抗体遺伝子ライブラリー(例えば、Ig cDNAから)を用いる新規選択のいずれかにより得られ得るという可能性を増加している。

【0224】抗体の組み合わせのライブラリーは、バクテリオファージアブラクまたは溶原菌のコロニーとしてスクリーニングされ得るバクテリオファージ発現システムにおいて生成されている(Huseら、(1989) Science 246: 1275; CatonおよびKoprowski (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 87: 6450; Mullinaxら、(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 87: 8095; Perssonら、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci.

(U. S. A.) 88: 2432)。バクテリオファージ抗体ディスプレイライブラリーおよび入ファージ発現ライブラリーの種々の実施様態が、記載されている(Kangら、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 88: 4363; Clacksonら、(1991) Nature 352: 624; McCaffertyら、(1990) Nature 348: 552; Burtonら、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 88: 10134; Hooogenboomら、(1991) Nucleic Acids Res. 19: 4133; Changら、(1991) J. Immunol. 147: 3610; Breitlingら、(1991) Gene 104: 147; Marksら、(1991) J. Mol. Biol. 222: 581; Barbasら、(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 89: 4457; HawkinsおよびWinter (1992) J. Immunol. 22: 867; Marksら、(1992) Biotechnology 10: 779; Marksら、(1992) J. Biol. Chem. 267: 16007; Lowmanら、(1991) Biochemistry 30: 10832; Lernerら、(1992) Science 258: 1313は、参考として本明細書中に援用される)。代表的には、バクテリオファージ抗体ディスプレイライブラリーは、固定化(例えば、親和性クロマトグラフィーにより反応性ファージについて富化するためのクロマトグラフィー樹脂への共有結合による)および/または標識(例えば、ブランクまたはコロニーリフトをスクリーニングするために)されているレセプター(例えば、ポリペプチド、炭水化物、糖タンパク質、核酸)でスクリーニングされる。

【0225】1つの特に有利なアプローチは、いわゆる単鎖フラグメント可変 (scFv) ライブラリーの使用である(Marksら、(1992) Biotechnology 10: 779; Winter GおよびMilstein C (1991) Nature 349: 293; Clacksonら、(1991) 前出; Marksら、(1991) J. Mol. Biol. 222: 581; Chaudharyら、(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 1066; Chiswellら、(1992) TIBTECH 10: 80; McCaffertyら、(1990) 前出; およびHustonら、(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 5879)。バクテリオファージコートタンパク質においてディスプレイされるscFvライブラリーの種々の実施様

態が記載されている。

【0226】1988年のはじめ、Fvフラグメントの単鎖アナログおよびそれらの融合タンパク質が、抗体工学法により確実に生成されている。第1の工程は、一般に、所望の結合特性を有するV_HおよびV_Lドメインをコードする遺伝子を得ることを包含する；これらのV遺伝子は、特定のハイブリドーマ細胞株から単離され得るか、組み合わせのV遺伝子ライブラリーから選択され得るか、またはV遺伝子合成により作製され得る。単鎖Fvは、成分V遺伝子と適切に設計されたリンカーペプチド（例えば、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_nまたは等価のリンカーペプチド（1つまたは複数））をコードするオリゴヌクレオチドとを結合することにより形成される。リンカーは、V_H-リンカー-V_LまたはV_L-リンカー-V_Hのいずれかの順序で第1のV領域のC-末端、および第2のV領域のN-末端に橋を架ける。原則として、scFv結合部位は、その親の抗体結合部位の親和性および特異性の両方を正確に複製し得る。

【0227】従って、scFvフラグメントは、柔軟なリンカーペプチドにより単一のポリペプチド鎖に連結されたV_HおよびV_Lドメインからなる。scFv遺伝子が組立てられた後、それらは、ファージミド中にクローニングされ、そしてバクテリオファージp111（遺伝子3）コートタンパク質との融合タンパク質としてM13ファージ（または類似の繊維状バクテリオファージ）の先端部で発現される。目的の抗体を発現するファージの富化は、予め決定されたエピトープ（例えば、標的抗原、レセプター）への結合についてscFv集団をディスプレイする組換えファージをパンニングすることにより達成される。

【0228】ライブラリーメンバーの連結ポリヌクレオチドは、スクリーニング手順または選択手順後のライブラリーメンバーの複製に関する基礎を提供し、そしてヌクレオチド配列決定による、ディスプレイされたペプチド配列またはV_HおよびV_Lアミノ酸配列の正体の決定のための基礎をも提供する。ディスプレイされたペプチド（1つまたは複数）または単鎖抗体（例えば、scFv）および／またはそのV_HおよびV_LドメインあるいはそれらのCDRは、適切な発現システムにクローニングされ得、そして発現され得る。しばしば、単離されたV_HおよびV_Lドメインをコードするポリヌクレオチドは、定常領域（C_HおよびC_L）をコードするポリヌクレオチドに連結され、完全な抗体（例えば、キメラ、または完全なヒトの抗体）、抗体フラグメントなどをコードするポリヌクレオチドを形成する。しばしば、単離されたCDRをコードするポリヌクレオチドは、適切な可変領域フレームワーク（および随意に定常領域）をコードするポリヌクレオチドに融合され、完全な抗体（例えば、ヒト化または完全なヒト抗体）、抗体フラグメントなどを

コードするポリヌクレオチドを形成する。抗体は、免疫親和性クロマトグラフィーにより、調製量の抗原を単離するために用いられ得る。このような抗体の種々の他の使用は、疾患（例えば、腫瘍形成）を診断／または段階づけすること、および治療応用のために、疾患（例えば：腫瘍形成、自己免疫疾患、AIDS、心血管性疾患、感染症など）を処置することである。

【0229】種々の方法が、scFvライブラリーの組み合わせの多様性の増加が、結合種のレパートリー（イデオタイプスペクトル）を広げることについて報告されている。PCRの使用は、可変領域を、特定のハイブリドーマ供給源からか、または非免疫化細胞から遺伝子ライブラリーとして、迅速にクローニングすることを可能にし、これは組み合わせられ得るV_HおよびV_Lカセットの分類における組み合わせの多様性を供給する。さらに、V_HおよびV_Lカセットは、例えば、ランダムな変異誘発、疑似ランダムな変異誘発、または定方向変異誘発（directed mutagenesis）により、それ自身多様化させられ得る。代表的には、V_HおよびV_Lカセットは、相補性決定領域（CDR）（しばしば第3のCDR、CDR3）内またはその近くにおいて多様化される。酵素的インバースPCR変異誘発は、誤りがちなPCRおよび化学的変異誘発がそうであるように（Dengら、（1994）J. Biol. Chem. 269:9533）、scFv部位特異的変異体の比較的大きなライブラリーを構築することに関して単純かつ信頼し得る方法であることが示されている（Stemmerら、（1993）Biotechniques 14:256）。Riechmannら、（1993）Biochemistry 32:8848は、縮重オリゴヌクレオチドPCRおよび引き続いて生じるscFv変異体のファージディスプレイによる部位特異的ランダム化を用いる抗体scFvフラグメントの半合理的な設計を示した。Barbasら、（1992）前出は、ヒト破傷風トキソイド結合Fabの合成CDR領域における配列をランダム化することにより、偏った可変領域配列を用いることに起因する制限されたレパートリーサイズの問題を回避することを試みた。

【0230】CDRランダム化は、重鎖CDR3のみについて約1×10²⁰ CDR、そしておおよそ類似した数の重鎖CDR1およびCDR2の変異体、ならびに軽鎖CDR1-3変異体を作製する潜在力を有する。個々にまたは一緒に考慮すると、重鎖および／または軽鎖のCDRランダム化の組み合わせは、全ての可能な組み合わせを提示するクローンライブラリーを作製するために、膨大な数のバクテリオファージクローン（それらのほとんどは、非結合性である）の生成を必要とする。このような多数の初期形質転換体の生成は、現在の形質転換技術およびバクテリオファージディスプレイシステム

では、容易ではない。例えば、Barbasら、(1992) 前出は、 5×10^7 の形質転換体のみを生成し、これは、完全にランダム化されたCDRのライブラリーのごく小さな割合の潜在的多様性のみを提示する。【0231】これらの実質的な制限にも関わらず、scFvのバクテリオファージディスプレイはすでに、種々の有用な抗体および抗体融合タンパク質を産生している。二特異性の単鎖抗体は、効率的な腫瘍細胞溶解を仲介することが示されている(Gruberら、(1994) J. Immunol. 152: 5368)。抗Rev scFvの細胞内発現は、インビトロでのHIV-1ウイルス複製を阻害することが示されており(Duanら、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 91: 5075)、そして抗p21^{ras} scFvの細胞内発現は、Xenopus卵母細胞の減数分裂の成熟を阻害することが示されている(Bioccaら、(1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 197: 422)。HIV感染を診断するために用いられる組換えscFvもまた、報告されており、scFvの診断上の利用性が示されている(Lilleyら、(1994) J. Immunol. Meth. 171: 211)。scFvが第2のポリペプチド(例えば、毒素または線維素溶解性活性化タンパク質)に連結している融合タンパク質もまた報告されている(Holvostら、(1992) Eur. J. Biochem. 210: 945; Nichollsら、(1993) J. Biol. Chem. 268: 5302)。

【0232】広範な抗体多様性を有し、そして潜在的な配列組み合わせの非常に小さい割合のみをカバーし得る多くの従来のCDR変異誘発およびランダム化法の制限の多くを克服するscFvライブラリーを生成し得るならば、scFv抗体の数および質を治療上および診断上の使用に適切に大幅に改善され得る。これに取り組むために、本発明のインビトロおよびインビボシャッフリング法が、選択されたディスプレイされた抗体から得られた核酸から(代表的にPCR増幅またはクローニングにより)得られたCDRを組換えのために用いられる。このようなディスプレイされた抗体は、細胞、バクテリオファージ粒子、ポリソーム、または任意の適切な抗体ディスプレイシステムにおいて、ディスプレイされ得る。ここで抗体が、それをコードする核酸(1つまたは複数)と会合されている。ある改変例においては、CDRは最初に、抗体産生細胞(例えば、第WO92/03918号、第WO93/12227号、および第WO94/25585号に記載のように、免疫化した野生型マウス、ヒト、またはヒト抗体を作製し得るトランスジェニックマウス由来の形質細胞/脾細胞)(これはそれに由来するハイブリドーマを包含する)由来のmRNA(ま

たはcDNA)から得られる。

【0233】これらの方法のいずれかにより第1の選択回において選択された(代表的には、ディスプレイされた抗体が抗原(例えば、リガンド)に結合することに関する親和性選択による)ポリヌクレオチド配列は、プールされ、そしてこのプール(1つまたは複数)は、インビトロおよび/またはインビボ組換え、特にCDRのシャッフリングによりシャッフリングされ(代表的には、重鎖CDRが他の重鎖CDRでシャッフリングされ、そして軽鎖CDRが他の軽鎖CDRでシャッフリングされる)、組換えられた選択ポリヌクレオチド配列の集団を含有するシャッフリングされたプールを作製する。組換えられた選択ポリヌクレオチド配列は、ディスプレイされた抗体のような選択様式において発現され、そして少なくとも1回の引き続く選択回にかけられる。引き続く選択回(1回または複数回)において選択されたポリヌクレオチド配列は、直接使用され得、配列決定され得、そして/または所望の結合親和性を有する抗体が得られるまで1回またはそれ以上の更なるシャッフリングおよび引き続く選択の回にかけられ得る。選択された配列はまた、中立の抗体フレームワーク配列をコードするポリヌクレオチド配列(すなわち、抗原結合において非実質的な機能的効果を有する)と戻し交配され(例えば、ヒト可変領域フレームワークとの戻し交配による)、ヒト様配列抗体を作製し得る。一般に、戻し交配の間、引き続く選択は、予め決定された抗原への結合の特性を保有するように適用される。

【0234】あるいは、または公知の改変例との組み合わせにおいて、標的エピトープの結合価は、選択されたscFvライブラリーメンバーの平均結合親和性を調節するように、改変され得る。標的エピトープは、例えば、競合エピトープを含有すること、希釈、または当業者に公知の他の方法により、種々の密度で表面または基質に結合され得る。予め決定されたエピトープの高密度(結合価)は、比較的低い親和性を有するscFvライブラリーメンバーについて富化するために用いられ得る。一方、低密度(結合価)は、より高い親和性についてscFvライブラリーメンバーを優先的に富化し得る。

【0235】多様な可変セグメントを生成するために、ペプチド配列のランダム、疑似ランダム、または規定の配列の核セットをコードする合成オリゴヌクレオチドの集合は、予め決定された部位(例えば、CDR)への連結により挿入され得る。同様に、単鎖抗体カセット(1つまたは複数)の1つまたはそれ以上のCDRの配列多様性は、部位特異的な変異誘発、CDR置換などを用いてCDR(1つまたは複数)を変異させることにより拡大され得る。生じるDNA分子は、シャッフリングの前のクローニングおよび増幅のために宿主において増殖され得るか、または直接使用され得(すなわち、宿主細胞に

おける増殖の際に生じ得る多様性の損失を回避し得る)、そして選択されたライブラリーメンバーは、引き続いてシャッフルされる。

【0236】目的的可変セグメントペプチド配列または目的の単鎖抗体をコードするディスプレイされたペプチド/ポリヌクレオチド複合体(ライブラリーメンバー)は、親和性富化技術により、ライブラリーから選択される。これは、目的のペプチド配列に特異的な固定化された高分子またはエпитープ(例えば、レセプター、他の高分子、または他のエпитープ種)の手段により達成される。親和性選択手順を繰り返すことにより、所望の配列をコードするライブラリーメンバーの富化物が提供され、次いでこの富化物は、プールおよびシャッフル、配列決定、および/または更なる増殖および親和性富化のために単離され得る。

【0237】所望の特異性を有しないライブラリーメンバーは、洗浄により除去される。要求される洗浄の度合およびストリンジェンシーは、目的のそれぞれのペプチド配列または単鎖抗体、および固定化された予め決定された高分子またはエпитープに関して決定される。制御の所定の度合は、結合のインキュベーションおよび引き続く洗浄の条件を調整することにより、回収された新生のペプチド/DNA複合体の結合特性に影響を及ぼし得る。温度、pH、イオン強度、二価カチオン濃度、および洗浄の容量および持続時間は、固定化高分子に対する親和性の特別な範囲内で、新生のペプチド・DNA複合体について選択される。通常、高親和性の指標となる遅い解離速度に基づく選択は、しばしば最も実践的な経路である。これは、飽和量の遊離した予め決定された高分子の存在下における継続的なインキュベーション、または洗浄の容量、回数、および長さを増加させることのいずれかにより実施され得る。それぞれの場合において、解離した新生ペプチド/DNAまたはペプチド/RNA複合体の組換えは防止され、そして時間の増加とともに、徐々に親和性が高くなる新生のペプチド/DNAまたはペプチド/RNA複合体が回収される。

【0238】結合および洗浄の手順のさらなる改変は、特別な特徴を有するペプチドを見い出すために適用され得る。いくつかのペプチドの親和性は、イオン強度またはカチオン濃度に依存する。これは、ペプチドからこのタンパク質を除去するのに穏やかな条件が要求される場合の種々のタンパク質の親和性精製において用いられるペプチドについて有用な特徴である。

【0239】1つの改変は、scFvライブラリーが、異なる結合特異性を有するscFvの多重性について同時にスクリーニングされ得るような、多重結合標的(多重エпитープ種、多重レセプター種)の使用を包含する。scFvライブラリーのサイズが、しばしば潜在的なscFv配列の多様性を制限すると仮定すると、代表的に、可能な限りの大きなサイズのscFvライブラリ

ーを使用することが望ましい。多数の非常に大きなポリソームscFv-ディスプレイライブラリーを生成することの時間性および経済性の考慮は、障害になり得る。この実質的な問題を回避するために、多重性を有する予め決められたエпитープ種(レセプター種)が、単一のライブラリーにおいて同時にスクリーニングされ得るか、または多数のエпитープ種に対する逐次スクリーニングが用いられ得る。1つの改変において、それぞれ別個のビーズ(またはビーズのサブセット)にコードされる多重標的エпитープ種は、適切な結合条件下でポリソームディスプレイscFvライブラリーと混合およびインキュベートされ得る。次いで多重エпитープ種を含有するビーズの集合は、親和性選択により、scFvライブラリーメンバーを単離するために用いられ得る。一般に、引き続き親和性スクリーニング回は、ビーズの同一の混合物、そのサブセット、または1つのみまたは2つの個々のエпитープ種を含有するビーズを包含し得る。このアプローチは、効率的なスクリーニングを提供し、そして研究自動化法、バッチプロセッシング法、および高処理能力スクリーニング法と適合する。

【0240】種々の技術は、予め決定された高分子またはエпитープに対する十分な結合活性を有するように、ペプチドライブラリーまたは単鎖抗体ライブラリーを多様化するために、あるいはシャッフルの前または同時に、周囲的可変セグメントペプチドまたは V_H 、 V_L 、あるいはパンニングの初期の回において見い出されるCDRを多様化するために本発明において用いられ得る。1つのアプローチにおいて、ポジティブ選択されたペプチド/ポリヌクレオチド複合体(親和性富化の初期の回において同定される複合体)は、活性ペプチドの正体を決定するために配列決定される。次いでオリゴヌクレオチドは、これらの活性ペプチド配列に基づいて合成され、これはそれぞれの工程で取り込まれる全ての塩基を低レベルで使用し、一次オリゴヌクレオチド配列の僅かな改変例を生じる。次いでこの(僅かに)縮重したオリゴヌクレオチドの混合物は、適切な位置で可変セグメント配列中にクローニングされる。この方法は、開始ペプチド配列の規則正しい調節された改変例を生じ、次いでこれらはシャッフルされ得る。しかしこの方法は、個々のポジティブな新生ペプチド/ポリヌクレオチド複合体が、変異誘発の前に配列決定されることを必要とし、従って少数の回収された複合体の多様性を拡大し、そしてより高い結合親和性および/またはより高い結合特異性を有する変異体を選択するために有用である。ポジティブに選択された(特に可変領域配列の)ペプチド/ポリヌクレオチド複合体の変異原性PCR増幅である改変において、その増幅産物は、インビトロおよび/またはインビボでシャッフルされ、そして1回以上のさらなるスクリーニングの回が、配列決定の前に実施される。同一の一般的なアプローチは、多様性を拡大し、そして結合

親和性/特異性を増強するために、代表的には、シャッフリングの前または同時にCDRまたは隣接のフレームワーク領域を多様化することにより、単鎖抗体とともに用いられ得る。所望であれば、シャッフリング反応は、選択されたライブラリーメンバーとインビトロ組換えし得る変異原性オリゴヌクレオチドでスパイクされ得る。従って、合成オリゴヌクレオチドおよびPCRフラグメント（誤りがちな方法または高度に忠実な方法により合成された）の混合物がインビトロシャッフリング混合物に添加され、そして生じるシャッフルされたライブラリーメンバー（シャッフリング体）中に取り込まれ得る。

【0241】本発明のシャッフリングは、CDR改変体単鎖抗体の広大なライブラリーの生成を可能にする。このような抗体を生成する1つの方法は、シャッフリングの前またはシャッフリングと同時に、単鎖抗体および/またはCDRのランダム化中に合成CDRを挿入することである。合成CDRカセットの配列は、ヒトCDRの公知の配列データを参照することにより選択され、そして以下のガイドラインに従って実施者の判断により選択される：合成CDRは、公知のCDR配列に対して少なくとも40%の位置的な配列同一性を有し、そして好ましくは、公知のCDR配列に対して少なくとも50~70パーセントの位置的な配列同一性を有する。例えば、合成CDR配列の集合は、Kabatra, (1991)

前出に列挙された天然に存在するヒトCDR配列に基づいてオリゴヌクレオチド配列の集合を合成することにより生成され得る；合成CDR配列のプール（1つまたは複数）は、少なくとも一つの公知の天然に存在するヒトCDR配列に対して少なくとも40%の配列同一性を有するCDRペプチド配列をコードするように計算される。あるいは、天然に存在するCDR配列の集合が比較され得、ある残基位置に頻繁に（すなわち、公知のCDR配列の少なくとも5%において）用いられるアミノ酸が、対応する位置（1つまたは複数）で合成CDR中に取り込まれるように、コンセンサス配列を生成し得る。代表的には、いくつか（例えば、3~約50）の公知のCDR配列が比較され、そして公知のCDRの間の観測された天然配列の改変体が表にされ、そして観測された天然配列の改変体の全てまたはほとんどの順列を包含するCDRペプチド配列をコードするオリゴヌクレオチドの集合が合成される。限定されないが、例えば、ヒトV_H CDR配列の集合が、Tyr, Val, Phe、またはAspのいずれかであるカルボキシ末端アミノ酸を有する場合、合成CDRオリゴヌクレオチド配列のプール（1つまたは複数）は、カルボキシ末端のCDR残基がこれらのアミノ酸のいずれかであるように設計される。いくつかの実施形態では、CDR配列の集合においてある残基位置に天然に存在する残基以外の残基が取り込まれる：保存的なアミノ酸置換は、頻繁に取り込まれ、そして公知の天然に存在するCDR配列と比較して5残基

位置までが、非保存的なアミノ酸置換が取り込まれるように変更され得る。このようなCDR配列は、（第1回のスクリーニングの前の）最初のライブラリーメンバーにおいて用いられ、そして/または選択されたライブラリーメンバー配列のインビトロのシャッフリング反応をスパイクするために用いられ得る。規定の配列および/または縮重配列のこのようなプールの構築は、当業者により容易に達成される。

【0242】合成CDR配列の集合は、天然に存在するCDR配列であるとして知られていない、少なくとも1つのメンバーを含む。重鎖CDRにおけるN領域付加に対応するランダムまたは疑似ランダムな配列の一部を含有するかまたは含有しないかは、実施者の判断内にある；N領域配列は、V-DおよびD-J結合部に存在する1ヌクレオチド~約4ヌクレオチドの範囲である。合成重鎖CDR配列の集合は、少なくとも約100の独特のCDR配列を含み、代表的には少なくとも約1,000の独特CDR配列を含み、好ましくは、少なくとも約10,000の独特のCDR配列を含み、しばしば50,000より多い独特のCDR配列を含む；しかし、特に、保存的なアミノ酸置換が、保存的なアミノ酸置換基が天然に存在するヒトCDRにおけるその位置に存在しないか、またはまれに存在する（すなわち、0.1%未満）位置において許容される場合、ときには 1×10^5 ~ 1×10^6 の独特のCDR配列が存在することもあるが、通常、せいぜい約 1×10^5 の独特のCDR配列が集合中に含まれる。一般に、ライブラリーに含まれる独特のCDR配列の数は、ライブラリー中の最初の形質転換体の予測される数を10倍（a factor of 10）を超えて超過するべきでない。このような単鎖抗体は、一般に、少なくとも約 1×10^7 M⁻¹の親和性で、好ましくは少なくとも約 5×10^7 M⁻¹の親和性で、より好ましくは少なくとも 1×10^8 M⁻¹ ~ 1×10^9 M⁻¹またはそれ以上の親和性で、ときには 1×10^{10} M⁻¹またはそれ以上の親和性で、予め決定された抗原（例えば、免疫原）に結合する。頻繁には、予め決定された抗原は、例えばヒト細胞表面抗原（例えば、CD4、CD8、IL-2レセプター、EGFレセプター、PDGFレセプター）のようなヒトタンパク質、他のヒト生体高分子（例えば、トロンボモジュリン、プロテインC、糖質抗原、シアリルLewis抗原、L-セレクチン）、または非ヒト疾患関連高分子（例えば、細菌LPS、ビリオンカプシドタンパク質、またはエンベローブ糖タンパク質）などである。

【0243】所望の特異性を有する高親和性単鎖抗体は、種々のシステムにおいて操作および発現される。例えば、scFvは、植物中で産生されており（Firekら, (1993) Plant Mol. Biol. 23: 861）、そして原核生物系において容易に生成され得る（Owens R.JおよびYoung

RJ (1994) J. Immunol. Meth. 168: 149; Johnson SおよびBird RE (1991) Methods Enzymol. 203: 88)。さらに、単鎖抗体は、抗体全体またはその種々のフラグメントを構築する基礎として用いられ得る(Kettleboroughら、(1994) Eur. J. Immunol. 24: 952)。可変領域をコードする配列は、単離され得(例えば、PCR増幅またはサブクローニングにより)、そして免疫原性が好適に最小化されるヒトの治療的使用により適切なヒト配列抗体をコードするように、所望のヒト定常領域をコードする配列にスプライシングされ得る。生じる完全なヒトコード配列(1つまたは複数)を有するポリヌクレオチド(1つまたは複数)は、宿主細胞において発現され(例えば、哺乳動物細胞において発現ベクターから)、そして薬学的処方物のために精製され得る。

【0244】DNA発現構築物は、代表的には、コード配列に作動可能に連結された発現制御DNA配列を含有し、この配列は、天然に会合したプロモーター領域、または異種のプロモーター領域を含む。好ましくは、発現制御配列は、真核生物宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトし得るベクター中の真核生物プロモーターシステムである。一旦ベクターが適切な宿主中に取り込まれると、宿主は、ヌクレオチド配列の高レベルの発現、ならびに変異「操作された」抗体の収集および精製に適切な条件下で維持される。

【0245】上述のように、DNA配列は、配列が発現制御配列に作動可能に連結された(すなわち、構造遺伝子の転写および翻訳を確実にするように位置された)後に、宿主中で発現される。これらの発現ベクターは、代表的には、エピソームまたは宿主の染色体DNAの必須部分として、この宿主生物において複製可能である。一般に、発現ベクターは、所望のDNA配列で形質転換されたこれらの細胞の検出を可能にするために、選択マーカー(例えば、テトラサイクリンまたはネオマイシン)を含有する(例えば、米国特許第4,704,362号を参照のこと。これは、参考として本明細書中に援用される)。

【0246】真核の微生物(例えば、酵母)に加えて、哺乳動物の組織細胞培養物もまた、本発明のポリペプチドを生成するために用いられ得る(Winnacker, 「From Genes to Clones,」 VCH Publishers, N. Y., N. Y. (1987)を参照のこと。これは参考として本明細書中に援用される)。真核細胞は、実際に好ましい。なぜなら、無傷の免疫グロブリンを分泌し得る多数の適切な宿主細胞株が当該分野で開発されており、そしてこれは、CHO細胞株、種々のCOS細胞株、HeLa細胞、ミエローマ細胞株などを含むが、形質転換され

たB細胞またはハイブリドーマが好ましい。これらの細胞のための発現ベクターは、発現制御配列(例えば、複製起点、プロモーター、エンハンサー)(Queenら、(1986) Immunol. Rev. 89: 49)、および必要とされるプロセッシング情報部位(例えば、リボソーム結合部位、RNAスプライシング部位、ポリアデニル化部位、および転写終結配列)を含有し得る。好ましい発現制御配列は、免疫グロブリン遺伝子、サイトメガロウイルス、SV40、アデノウイルス、ウシバビロウイルスなどに由来するプロモーターである。

【0247】真核生物のDNA転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することにより増加され得る。エンハンサーは、プロモーターによる転写を増加する10bpと300bpとの間のシス作用性配列である。エンハンサーは、転写単位に対して5'または3'のいずれかにある場合、転写を効率的に増加し得る。それらはまた、イントロン内、またはコード配列自身の内部に位置される場合にも効果的である。代表的には、ウイルスのエンハンサーが使用され、これは、SV40エンハンサー、サイトメガロウイルスエンハンサー、ポリオマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーが含まれる。マウス免疫グロブリン重鎖エンハンサーのような、哺乳動物系由来のエンハンサー配列もまた、一般に使用される。

【0248】哺乳動物の発現ベクターシステムはまた、代表的に選択マーカー遺伝子を含有する。適切なマーカーの例は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子(DHFR)、チミジンキナーゼ遺伝子(TK)、または薬物耐性を与える原核生物遺伝子を包含する。最初の2つのマーカー遺伝子は、生育培地へのチミジンの添加をとともわずに生育する能力を欠如する変異体細胞株の使用を好む。次いで、形質転換された細胞は、非補充培地におけるそれらの生育能により同定され得る。マーカーとして有用な原核生物の薬物耐性遺伝子の例は、G418、ミコフェノール酸、およびハイグロマイシンへの耐性を与える遺伝子を包含する。

【0249】目的のDNAセグメントを含有するベクターは、細胞の宿主タイプに依存して周知の方法により宿主細胞中に導入され得る。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションが、原核細胞に一般に利用されるが、リン酸カルシウム処理、リポフェクション、またはエレクトロポレーションは、他の細胞の宿主に用いられ得る。哺乳動物を形質転換するために用いられる他の方法は、ポリブレン、プロトプラスト融合、リボソーム、エレクトロポレーション、およびマイクロインジェクションの使用を含む(一般に、Sambrookら、前出を参照のこと)。

【0250】一旦発現されると、抗体、個々の変異免疫グロブリン鎖、変異抗体フラグメント、および本発明の

他の免疫グロブリンポリペプチドは、当該分野の標準的な手順に従って精製され得る。この手順は、硫酸アンモニウム沈澱、フラクションカラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを包含する（一般に、Scopes,

R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N. Y. (1982) を参照のこと）。一旦部分的にまたは所望の均一性まで精製されると、次いでポリペプチドは、治療的に、またはアッセイ手順、免疫蛍光染色などの開発および実施において用いられ得る（一般に、*Immunological Methods*, IおよびII巻、LefkovitsおよびPernis編、Academic Press, New York, N. Y. (1979および1981) を参照のこと）。

【0251】本発明の方法により生成される抗体は、診断および治療に用いられ得る。限定のためではなく、説明のために、それらは、ガン、自己免疫疾患、またはウイルス感染症を処置するために用いられ得る。ガンの処置について、抗体は、代表的に癌細胞において優先的に発現される抗原（例えば、erbB-2、CEA、CD 33、および当業者に周知の多数の他の抗原および結合メンバー）に結合する。

【0252】（酵母ツーハイブリッドスクリーニングアッセイ）シャッフリングはまたは、予め決定されたポリペプチド配列に結合するライブラリーメンバーを同定するためのツーハイブリッドスクリーニングシステムをスクリーニングすることにより得られた選択されたライブラリーメンバーのプールを組換え的に多様化するために用いられ得る。選択されたライブラリーメンバーは、プールされ、そしてインビトロおよび／またはインビボ組換えによりシャッフルされる。次いでシャッフルされたプールは、上記の予め決定されたポリペプチド配列（例えば、SH2ドメイン）に結合するライブラリーメンバー、または別の予め決定されたポリペプチド配列（例えば、他のタンパク質の種由来のSH2ドメイン）に結合するライブラリーメンバーを選択するために、酵母ツーハイブリッドシステムにおいてスクリーニングされ得る。

【0253】予め決定されたポリペプチド配列に結合するポリペプチド配列を同定するための1つのアプローチは、予め決定されたポリペプチド配列が融合タンパク質中に存在するいわゆる「ツーハイブリッド」システムを用いている（Chienら、(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 88:9578）。このアプローチは、転写のアクティベーター（Fields SおよびSong O (1989)

Nature 340:245）、酵母Gal4転写タンパク質の再構成を通して、インビボでのタンパク質-タンパク質相互作用を同定する。代表的には、この方法は、酵母Gal4タンパク質の特性に基づく。このタ

ンパク質は、DNA結合および転写の活性化に機能する分離可能なドメインからなる。2つのハイブリッドタンパク質（一方は、公知のタンパク質のポリペプチド配列に融合された酵母Gal4 DNA結合ドメインからなり、他方は、第2のタンパク質のポリペプチド配列に融合されたGal4活性化ドメインからなる）をコードするポリヌクレオチドが構築され、酵母宿主細胞に導入される。2つの融合タンパク質間の分子間の結合は、Gal4 DNA結合ドメインとGal4活性化ドメインとを再構成し、これはGal4結合部位に作動可能に連結されたレポーター遺伝子（例えば、lacZ、HIS 3）の転写の活性化を導く。代表的に、ツーハイブリッド法は、公知のタンパク質に相互作用する新規のポリペプチド配列を同定するために用いられる（Silver SCおよびHunt SW (1993) *Mol. Biol. Rep.* 17: 155; Durfeeら、(1993) *Genes Devel.* 7: 555; Yangら、(1992) *Science* 257: 680; Lubanら、(1993) *Cell* 73:1067; Hardyら、(1992) *Genes Devel.* 6: 801; Bartelら、(1993) *Biotechniques* 14: 920; およびVojtekら、(1993) *Cell* 74: 205）。しかし、ツーハイブリッド法の変法が、第2の公知のタンパク質への結合に影響する公知のタンパク質の変異を同定するために用いられている（Li BおよびFields S (1993) *FASEB J.* 7: 957; Laloら、(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 90: 5524; Jacksonら、(1993) *Mol. Cell. Biol.* 13: 2899; およびMaduraら、(1993) *J. Biol. Chem.* 268: 12046）。ツーハイブリッドシステムはまた、2つの公知のタンパク質の相互作用する構造ドメインを同定するため（Bardwellら、(1993) *med. Microbiol.* 8: 1177; Chakrabortyら、(1992) *J. Biol. Chem.* 267: 17498; Staudingerら、(1993) *J. Biol. Chem.* 268:4608; およびMilne GTおよびWeaver DT (1993) *Genes Devel.* 7: 1755）、または単一のタンパク質のオリゴマー形成に機能するドメインを同定するためにも用いられている（Iwabuchiら、(1993) *Oncogene* 8: 1693; Bogerdら、(1993) *J. Virol.* 67: 5030）。ツーハイブリッドシステムの改変は、タンパク質分解酵素のインビボでの活性を研究するために用いられている（Dasmahapatraら、(1992)

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89: 4159)。あるいは、*E. coli*/BC CP 相互作用のスクリーニングシステム (Germinoら、(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 90: 933; Guarente L (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 90: 1639) は、相互作用するタンパク質配列 (すなわち、ヘテロ二量体化するか、またはより高次のヘテロ多量体を形成するタンパク質配列) を同定するために用いられ得る。ツーハイブリッドシステムにより選択された配列は、プールおよびシャッフルされ、そして予め決定された結合配列を含有するハイブリッドに結合するポリペプチド配列を同定するためのスクリーニングの1つ以上の引き続く回のために、ツーハイブリッドシステムに導入され得る。このようにして同定された配列は、コンセンサス配列 (単数または複数) およびコンセンサス配列核を同定するために比較され得る。

【0254】(改善/別のフォーマット)

(添加剤) 1つの局面において、改善されたシャッフリング法は、関連する配列ポリヌクレオチドの再アニーリングまたは望望への割合または程度を増大させる少なくとも1つの添加剤の添加を含む。一般に、ミスマッチ配列のハイブリッド安定性を増加させる添加剤を使用して、実質的に変異したライブラリーメンバーを生じる頻度を増大させ得る (すなわち、より高い変異密度を有する)。添加剤に加えて、イオン強度 (例えば、 Na^+ および/または K^+ イオン濃度) の調節により、ミスマッチハイブリッドの相対的な安定性を調節し得、その結果、増加した塩濃度が、ミスマッチハイブリッドの頻度を増加させ、そして複数の変異を有するライブラリーメンバーの形成に寄与し得る。

【0255】1つの実施態様において、添加剤は、ポリエチレングリコール (PEG) であり、代表的には、最終濃度0.1~25パーセントまで、しばしば最終濃度2.5~15パーセントまで、最終濃度約10パーセントまで、シャッフリング反応に添加される。1つの実施態様において、添加剤はデキストラン硫酸であり、代表的には、最終濃度0.1~25パーセントまで、しばしば最終濃度約10パーセントまで、シャッフリング反応に添加される。1つの実施態様において、添加剤は、インビトロでの再アニーリングの配列特異性を減少し、そして無差別なハイブリダイゼーションおよび/または組換えを促進する薬剤である。別の実施態様において、添加剤は、インビトロでの再アニーリングの配列特異性を増加させ、そして正確なハイブリダイゼーションおよび/または組換えを促進する薬剤である。この反応に干渉しない他の長鎖ポリマーもまた、使用され得る (例えば、ポリビニルピロリドンなど)。

【0256】1つの局面において、改善されたシャッフ

リング法は、カチオン性界面活性剤である少なくとも1つの添加剤の添加を包含する。適切なカチオン性界面活性剤の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB)、臭化ドデシルトリメチルアンモニウム (DTAB)、および塩化テトラメチルアンモニウム (TMA C) など。

【0257】1つの局面において、改善されたシャッフリング法は、インビトロでの相同対形成および/または鎖交換を触媒するかまたは非触媒的に増強する組換え形成性タンパク質である少なくとも1つの添加剤の添加を包含する。適切な組換え形成性タンパク質の例として、以下が挙げられるが、これらに限定されない: *E. coli* recAタンパク質、T4 uvsXタンパク質、*Ustilago maydis* 由来の rec1タンパク質、他の種由来の他の recAファミリーリコンビナーゼ、一本鎖結合タンパク質 (SSB)、リボヌクレオタンパク質A1など。ヌクレアーゼおよびブルーフリーディングポリメラーゼは、しばしば3' 末端の完全性の維持を改善するために含まれる。これらのタンパク質添加剤のそれぞれは、複数回の反復的な配列組換えならびに選択および/またはスクリーニングによってそれ自身改善され得る。本発明は、このような改善された添加剤およびシャッフリングをさらに増強するためのそれらの使用を包含する。

【0258】(リコンビナーゼタンパク質) リコンビナーゼは、外来性標的化ポリヌクレオチドと共に含まれる場合は、標的化ポリヌクレオチドと外来性の予め決定されたDNA配列との間の組換え頻度および/または局在化頻度において測定可能な増加を提供するタンパク質である。本発明では、リコンビナーゼは、全てが特に以下の同一の機能の全てまたはほとんどを有する RecA様組換えタンパク質のファミリーをいう: (i) その相同標的上で標的化ポリヌクレオチドに正確に結合しそして位置決めする、リコンビナーゼタンパク質の能力、および (ii) 相補的外来配列を効率的に見出しそしてこれに結合する、リコンビナーゼタンパク質/標的化ポリヌクレオチド複合体の能力。同定されている多くの変異型 recA様タンパク質の野生型タンパク質に加えて、最も良く特徴付けられている recAタンパク質は、*E.*

coli 由来のものである (例えば、recA803)。さらに多くの微生物が、鎖転移活性を有する recA様リコンビナーゼを有する (例えば、Fugisawaraら、(1985) Nucl. Acids res. 13: 7473; Hsiehら、(1986) Cell 44: 885; Hsiehら、(1989) J. Biol. Chem. 264: 5089; Fishelら、(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3683; Cassutoら、(1987) Mo

1. Gen. Genet. 208: 10; Ganevaら、(1987) Mol. Cell. Biol. 7: 3124; Mooreら、(1990) J. Biol. Chem. 265: 11108; Keeneら、(1984) Nucl. Acids Res. 12: 3057; Kimiec, (1984) Cold Spring Harbor Symp. 48: 675; Kimeic, (1986) Cell 44: 545; Kolodnerら、(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5560; Suginoら、(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3683; Halbrookら、(1989) J. Biol. Chem. 264: 21403; Eisenら、(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7481; McCarthyら、(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5854; Lowenhauptら、(1989) J. Biol. Chem. 264: 20568、その全体が本明細書中で参考として援用される。このようなリコンビナーゼタンパク質の例として、例えば、以下が挙げられるが、これらに限定されない: recA、recA803、uvrX、および他の recA 変異体および recA 様リコンビナーゼ (Roca, A. I. (1990) Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. 25: 415)、sepl (Kolodner ら、(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 84: 5560; Tishkoffら、Molec. Cell. Biol. 11: 2593)、RuvC (Dunderdaleら、(1991) Nature 354: 506)、DST2、KEM1、XRN1 (Dykstraら、(1991) Molec. Cell. Biol. 11: 2583)、STP α /DST1 (Clarkら、(1991) Molec. Cell. Biol. 11: 2576)、HPP-1 (Mooreら、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 88: 9067)、他の真核生物リコンビナーゼ (Bishopら、(1992) Cell 69: 439; Shinoharaら、(1992) Cell 69: 457; 本明細書中で参考として援用される)。RecAは、E. coli 株 (例えば、E. coli JC12772株および JC15369株 (A. J. Clarkおよび M. Madiraju, University of California-Berkeley から入手可能)) から精製され得る。これらの株は、細胞あたり高コピー数

で存在する「ランアウェイ」複製プラスミドベクター上に recAコード配列を含む。recA803タンパク質は、野生型 recA の高活性変異体である。当該分野は、例えば、Drosophila、酵母、植物、ヒト、および非ヒト哺乳動物細胞由来の、recA に類似する生物学的特性を有するタンパク質 (すなわち、recA 様リコンビナーゼ) を含むリコンビナーゼタンパク質のいくつかの例を教示する。

【0259】RecAタンパク質は、代表的には、このタンパク質を過剰産生する細菌株から得られる: 野生型 E. coli recAタンパク質および変異型 recA803タンパク質が、このような株から精製され得る。あるいは、recAタンパク質はまた、例えば、Pharmacia (Piscataway, NJ) から購入し得る。

【0260】RecAタンパク質は、一本鎖DNAをコーティングする場合に核タンパク質フィラメントを形成する。この核タンパク質フィラメントにおいて、recAタンパク質の1つのモノマーが、約3ヌクレオチドに結合する。recAタンパク質の一本鎖DNAをコーティングするこの特性は、本質的に配列依存性であるが、特定の配列は、ポリヌクレオチド (例えば、核形成配列) 上での recA の最初のロードを好む。核タンパク質フィラメント (単数または複数) は、本質的に任意の配列関連ポリペプチド上で形成されてシャッフルされ、そして細胞 (例えば、細菌、酵母、また哺乳動物細胞) 内で形成され、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAの両方と複合体を形成し得る。

【0261】部位特異的組換えを用いて、反復的な配列組換えを達成し得る。代表的には、シャッフルされ得る配列は、1つ以上の部位特異的組換え配列 (例えば、しばしば2つの逆転13塩基反復および8bpスパーサーからなるFLP組換え標的部位 (FRT) (O' Gormanら、(1991) Science 251: 1351; Parsonsら、(1990) J. Biol. Chem. 265: 4527; Aminら、(1991) Mol. Cell. Biol. 11: 4497、本明細書中で参考として援用される)) に隣接される。FRT配列が用いられる場合、FLPリコンビナーゼはまた、代表的には、インビトロまたは宿主細胞内で発現されるかのいずれかである。ここで、組み換えられるべき配列は、導入されるかまたは既に存在する。FLP/FRT系の代替は、以下を含むがこれらに限定されない: ファージP1のcre/lox系 (HoessおよびAbremski (1985) J. Mol. Biol. 181: 351)、 γ / δ 分解酵素 (Steitzら、(1990) Quarterly Rev. Biophys. 23: 205)、 λ のattB/attP系 (Nunes-Dubyら、(1987) Cell 50: 779)、

およびバクテリオファージ入、φ80、P22、P2、P4、P1由来の同様の部位特異的組換え系、および実施者によって選択される他の同様の部位特異的組換え系。リコンビナーゼのインテグラーゼファミリーに関する手引きは、Argosら、(1986) EMBO J. 5: 433 (本明細書中で参考として援用される)に見出される。

【0262】(エキソヌクレアーゼ)1つの局面において、改善されたシャッフリング法は、エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素である少なくとも1つの添加剤の添加を包含する。この活性は、非ブルーフリーディングポリメラーゼによって触媒されるシャッフリング増幅反応の際に産物のポリヌクレオチドの3'末端に導入された非鋳型ヌクレオチドを除去することにおいて活性である。エキソヌクレアーゼ活性を有する適切な酵素の例としては、Pfuポリメラーゼが挙げられるが挙げられるが、これらに限定されない。エキソヌクレアーゼの例は、以下である：

Bal31

バクテリオファージ入エキソヌクレアーゼ

E. coliエキソヌクレアーゼI

E. coliエキソヌクレアーゼIII

E. coliエキソヌクレアーゼVII

バクテリオファージT7遺伝子6。

【0263】(スタッターリング(stuttering))1つの局面では、改善されたシャッフリング法は、再アニーリングされフラグメント化されたライブラリーメンバーポリヌクレオチドの増幅(すなわち、ポリメラーゼでの伸長)の少なくとも1サイクルが、不完全に伸長された増幅産物の実質的な(代表的には少なくとも20パーセント以上)画分を生じる条件下で行われる改変を含む。増幅産物(不完全に伸長された増幅産物を含む)は変性され、そして再アニーリングおよび増幅の少なくとも1回のさらなるサイクルに供される。この改変(少なくとも1サイクルの再アニーリングおよび増幅によって不完全に伸長された産物の実質的な画分が提供される)は、「スタッターリング」と呼ばれ、そして次の増幅の回で、不完全に伸長された産物は、異なる配列間連テンプレート種上で再アニールしそして、伸長をブライムする。

【0264】1つの局面では、改善されたシャッフリング法は改変を包含する。ここで、少なくとも1サイクルの増幅が、第1のポリヌクレオチド種に対応する種々の長さの重複している一本鎖DNAフラグメントの収集物または関連配列ポリヌクレオチド種のセットを使用して行われ、ここで、各重複フラグメントは、テンプレートとして作用する第2のポリヌクレオチド種をハイブリダイズしそしてこのポリヌクレオチド種由来のポリヌクレオチド鎖伸長を各々ブライムし、これにより配列組換えポリヌクレオチドが形成され得る。ここで、この配列組

換えポリヌクレオチドは、テンプレートとして作用する第2のポリヌクレオチド種の隣接部分と共に、少なくとも1つの第1のポリヌクレオチド種の一部を含む。1つの改変において、テンプレートとして作用する第2のポリヌクレオチド種は、ウラシル(すなわち、Kunkel型テンプレート)を含み、そして実質的に細胞内では複製不能である。本発明のこの局面はまた、この改変の少なくとも2回の反復サイクルを包含し得る。1つの実施態様では、Levitichkinら、(1995) Mol. Biol. 29: 572の方法を用いるシャッフリングの反復サイクル(これによりPCRフラグメントの部分的伸長が生じる)は、反復的にシャッフルされる親配列のプールからキメラを生じるために使用される。

【0265】1つの局面では、改善されたシャッフリング法は、増幅の少なくとも1サイクルが、テンプレートスイッチングを促進する適切な条件下で添加剤またはポリメラーゼを用いて行われる改変を包含する。増幅のためにTaqポリメラーゼが使用される実施態様において、recAまたは他のポリメラーゼの添加によって、テンプレートスイッチングが増強される。テンプレートスイッチングはまた、当業者に公知の他の手段のなかで、DNAテンプレート濃度を増加させることによって増加され得る。

【0266】一般的な方法の実施態様において、配列組換えポリヌクレオチドのライブラリーは、天然に存在する遺伝子または遺伝子の対立遺伝子である配列関連ポリヌクレオチドから生成される。この局面において、少なくとも50の連続的ヌクレオチド(少なくとも70パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも90パーセントの配列同一性を有する)の領域を含む少なくとも3つの天然に存在する遺伝子および/または対立遺伝子が、ハイブリッド選択によるかまたはデータベースからの配列データを用いるコンピュータ配列分析によって、遺伝子配列のプールから選択される。選択された配列は、クローニングによるかまたはDNA合成を介するか、のいずれかで、ポリヌクレオチドとして得られ、そして本発明の種々の実施態様のいずれかによってシャッフルされる。

【0267】本発明の1つの実施態様において、本方法は、開示された任意のシャッフリング法によって生成される配列組換えポリヌクレオチドからシャッフリングされていない産物(例えば、親配列)を除去するさらなる工程を包含する。シャッフリングされていない産物は、以下を用いて増幅を行うことによって、除去され得るかまたは避けられ得る：(1)第1の親ヌクレオチド配列種にハイブリダイズするが、第2の親ポリヌクレオチド配列種に実質的にハイブリダイズしない、第1のPCRプライマー、および(2)第2の親ポリヌクレオチド種にハイブリダイズするが、第1の親ポリヌクレオチド種

に実質的にハイブリダイズしない第2のPCRプライマー。その結果、増幅は、第1のPCRプライマーにハイブリダイズする第1の親配列の一部を含み、かつ第2のPCRプライマーにハイブリダイズする第2の親配列の一部もまた含むテンプレート上から生じ、従って、配列組換えポリヌクレオチドのみが増幅される。

【0268】本発明の1つの実施態様において、「架橋」遺伝子が合成され得る。2つ以上の親ポリヌクレオチド（例えば、遺伝子）が、PCR増幅に有効な相同組換えまたは有効なクロスプライミングに十分な配列類似性を欠く場合、親配列との十分な配列同一性を共有する中間（または「架橋」）遺伝子が合成され得る。架橋遺伝子は、活性である必要も、表現型または選択可能な特性を付与される必要もなく、親配列のシャッフリングを達成するのに十分な配列同一性を有するテンプレートを提供するだけでよい。架橋遺伝子の中間相同性、および必要な配列（単数または複数）は、コンピュータによって、または手動で決定され得る。

【0269】本発明はまた、原核生物細胞または真核生物細胞のいずれかにおいて、インビボで反復的組換えを行うためのさらなるフォーマットを提供する。これらのフォーマットは、プラスミド間の組換え、ウイルス間の組換え、プラスミドとウイルスとの間の組換え、染色体とプラスミドまたはウイルスとの間の組換え、および分子内組換え（例えば、プラスミド上の2つの配列間）を包含する。反復組換えは、完全にインビボで行われ、これによりインビボ組換えの断続的な回は、選択またはスクリーニングの回によって散在される。インビボフォーマットはまた、インビトロフォーマットと組み合わせて用いられ得る。例えば、1つのフォーマットは、インビトロシャッフリングを1回、選択を1回、インビボシャッフリングを1回、選択をさらに1回、インビトロシャッフリングをさらに1回、および選択をさらに1回、行い得る。種々のインビボフォーマットが、現在順次考えられている。

【0270】(a) プラスミド-プラスミド組換え組換えのための最初の基質は、遺伝子の変異形態を含むポリヌクレオチドの収集体である。変異形態は、通常、基質間での相同組換えを可能にするに十分な互いの実質的な配列同一性を示す。ポリヌクレオチド間の多様性は、天然のもの（例えば、対立形質または種改変体）、誘導されたもの（例えば、誤りがちなPCR、合成遺伝子、コドン使用改変配列改変体）、またはインビトロ組換えの結果である。基質間には、少なくとも、組換えによって開始物質よりも多様な産物が生じ得る、十分な多様性が存在しなければならない。少なくとも2つの部位で異なる少なくとも2つの基質が存在しなければならない。しかし、通常は、 $10^3 \sim 10^8$ メンバーの基質のライブラリーが使用される。多様性の程度は、組み換えられている基質の長さおよび進化されるべき機能的変化の

範囲に依存する。0.1～25%の間の位置での多様性が、典型的である。

【0271】多様な基質が、プラスミドに取り込まれる。プラスミドは、しばしば、標準的なクローニングベクター（例えば、細菌のマルチコピープラスミド）である。しかし、以下に記載するいくつかの方法において、プラスミドは、MOB機能を含む。基質は、同じまたは異なるプラスミドに取り込まれ得る。しばしば、異なるタイプの選択マーカーを有する少なくとも2つの異なるタイプのプラスミドが、少なくとも2つのタイプのベクターを含む細胞の選択を可能にするために用いられる。また、異なるタイプのプラスミドが用いられる場合、異なるプラスミドが、2つの別個の不適合な群から得られて、細胞内での2つの異なるプラスミドの安定な共存を可能にし得る。それにもかかわらず、同じ不適合な群由来のプラスミドが、相同組換えを生じさせるに十分な時間、同じ細胞内で共存し得る。

【0272】多様な基質を含むプラスミドは、任意のトランスフェクション法（例えば、化学的な形質転換、天然の能力、形質導入、エレクトロポレーション、またはbiolistics）によって、最初に細胞へ導入される。しばしば、プラスミドは、飽和濃度（最大トランスフェクション能力に関して）またはその付近で存在して、同じ細胞への1つ以上のプラスミドが侵入する確率を増大させる。種々の基質を含むプラスミドは、同時にまたは複数回、トランスフェクトされ得る。例えば、後者のアプローチにおいて、細胞はプラスミドの第1のアリコートでトランスフェクトされて、トランスフェクタントは選択されそして増殖され、次いでプラスミドの第2のアリコートで感染され得る。

【0273】プラスミドが細胞内へ導入されると、組換え遺伝子を生成するための基質間の組換えは、単に細胞を増殖させることによって、複数の異なるプラスミドを含む細胞内で起こる。しかし、たった1つのプラスミドしか受容していない細胞は、組換えを行う可能性が低く、そして進化のためのこのようなプラスミドに対する基質の潜在的な寄与が、無駄になる。進化の割合は、全ての基質に組換えを行わせることによって、増加され得る。これは、トランスフェクトされた細胞をエレクトロポレーションに供することによって達成され得る。エレクトロポレーションの条件は、外来DNAを細胞に導入するために従来使用されているものと同一である（例えば、1,000～2,500ボルト、400μF、および1～2mM gap）。これらの条件下で、プラスミドは、細胞間で交換され、これにより全ての基質が組み換えられることが可能になる。さらに、組換えの産物は、互いまたは元の基質とのさらなる回の組換えを受け得る。進化の割合はまた、接合性転移（conjugative transfer）の使用によって増大され得る。接合性転移を利用するために、基質を、MOB遺

伝子を有するプラスミド中にクローニングし、そして *tr a* 遺伝子がまた、MOB 遺伝子に対してシスまたはトランスで提供され得る。接合性転移の効果は、プラスミドが細胞間で移動することを可能にし、そして任意の基質間での組換えを可能にし、そして以前の組換えの産物が単に培養物を増殖させることによって起こるという点で、エレクトロポレーションに非常に類似している。これらのベクターにおいて接合性転移がどのように活用されるかの詳細は、以下により詳細に議論される。進化の割合はまた、ミューテーター宿主細胞（例えば、Mut L, S, D, T, H; ヒト毛細管拡張性運動失調 (ataxia telangiectasia) 細胞) の使用によって増大され得る。

【0274】細胞が増殖しそして組み換えられる時間は、もちろん、細胞タイプに伴って変化し得るが、重大ではない。なぜなら、わずかな程度の組換えさえ、出発物質に比較して多様性を増大させるからである。組換え遺伝子を含むプラスミドを有する細胞が、所望の機能についてのスクリーニングまたは選択に供される。例えば、進化している基質が薬物耐性遺伝子を含む場合、細胞は薬物耐性について選択される。スクリーニングまたは選択を生き残った細胞は、一回以上のスクリーニング／選択、続く組換えに供され得るか、またはさらなる回数の組換えに直接供され得る。

【0275】組換えの次の回は、以前の回に依存しているいくつかの異なるフォーマットによって達成され得る。例えば、組換えのさらなる回が、単に上記のプラスミドのエレクトロポレーションまたは接合媒介性細胞内転移を再開することによってなされ得る。あるいは、新鮮な基質または基質（前の基質と同じまたは異なる）は、選択／スクリーニングを生き残っている細胞にトランスフェクトされ得る。必要に応じて、新しい基質は、異なる選択マーカーを有するプラスミドベクターおよび／またはもとのプラスミドと異なる不適合なグループからのプラスミドベクターに含まれる。さらなる代替として、選択／スクリーニングを生き残っている細胞が、2つの部分集団に細分割され得、1方の部分集団からプラスミドDNAが抽出され、そしてもう一方にトランスフェクトされる。ここで、2つの部分集団からのプラスミド由来の基質はさらなる回の組換えを受ける。後者の2つの選択肢 (option) のいずれかにおいて、進化の割合は、上記のように、エレクトロポレーション、接合、またはミューテーター細胞を用いることによって増大され得る。なおさらなる改変では、スクリーニング／選択を生き残っている細胞由来のDNAは、抽出され得、そしてインビトロDNAシャッフリングに供され得る。

【0276】第2回目の組換え後、第2回目のスクリーニング／選択が、好ましくはストリンジェンシーを増大させた条件下で行われる。所望であれば、さらなる回の組換えおよび選択／スクリーニングが、第2回目と同じ

ストラテジーを用いて行われ得る。組換えおよび選択／スクリーニングの次の回を用いて、生き残っている組換え基質は、所望の表現型を取得するように進化する。代表的には、インビトロ反復組換えのこの方法および他の方法において、所望の表現型を獲得した組換えの最終産物は、開始物質と0.1%~25%の位置で異なり、そして世代あたり 10^{-9} 位置あたり約1つの変異の天然に獲得される変異の割合より多い大きさの割合の程度（例えば、少なくとも10倍、100倍、1000倍または10,000倍）進化していた (Anderson & Hughes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 906-907 (1996) を参照のこと)。

【0277】図26は、プラスミド-プラスミド組換えの例示的なスキームを示す。図のパネルAは、プラスミドにクローニングされた改変体遺伝子のライブラリーを示す。次いで、ライブラリーは、細胞に導入される。パネルBに示すように、いくつかの細胞は単一のプラスミドを取り込み、そして別の細胞は2つのプラスミドを取り込む。2つのプラスミドを取り込んだ細胞については、プラスミドは、組換わってパネルCに示す産物を生じる。次いで、プラスミドは、パネルDに示すように、エレクトロポレーションまたは接合によって細胞間で移され得、そしてさらに組換えが起こってパネルEに示すような産物が生じ得る。次いで、スクリーニング／選択により、選択／スクリーニングにより同定されるように設計された特性を獲得するように進化した遺伝子を有するプラスミドを単離する。選択の過程において、2つのプラスミド（この一方だけが選択された表現型に寄与する）を有する細胞は、パネルFに示すように、もう一方のプラスミドを欠失し得る。

【0278】(b) ウイルス-プラスミド組換え
プラスミド-プラスミド組換えに用いられるストラテジーはまた、ウイルス-プラスミド組換え（通常は、ファージプラスミド組換え）にも使用され得る。しかし、特にウイルスの使用に関するいくつかのさらなる注釈が適切である。組換えのための最初の基質は、プラスミドおよびウイルスベクターの両方にクローニングされる。基質がウイルスベクターに挿入され、そしてプラスミドに挿入されることは、通常重要ではないが、通常ウイルスベクターは、プラスミド由来の異なる基質を含むはずである。以前のように、プラスミドは、代表的には、選択マーカーを含む。プラスミドおよびウイルスベクターは共に、上記のように、トランスフェクションによって細胞に導入され得る。しかし、より有効な手順は、プラスミドで細胞をトランスフェクションし、トランスフェクタントを選択し、そしてウイルスでトランスフェクタントを感染させることである。多くのウイルスの感染の効率は、細胞の100%にほぼ等しいので、この経路でトランスフェクションされそして感染されたほとんどの細

胞は、異なる基質を有するプラスミドおよびウイルスの両方を有する。

【0279】相同組換えは、プラスミドとウイルスとの間で起こり、組換えプラスミドおよび組換えウイルスの両方を生成する。フィラメント様ファージのようないくつかのウイルスについては、細胞内DNAが、2本鎖および一本鎖の形態の両方で存在し、その両方が組み換えを行い得る。ウイルスが迅速に細胞を殺さなければ、組換えは、エレクトロポレーションの使用または接合によって増大されて、細胞間でプラスミドを移動させる。組換えはまた、1つの細胞由来の子孫ウイルスが他の細胞に再感染することを可能にすることによって、ウイルスのいくつかのタイプを増大させ得る。いくつかのウイルスのタイプについては、ウイルス感染細胞は、重複感染に耐性を示す。しかし、このような耐性は、高多重度の感染により、および/または重複感染に対する耐性が低下しているウイルスの変異株を用いて克服され得る。

【0280】プラスミド含有細胞をウイルスで感染させた結果は、ウイルスの性質に依存する。いくつかのウイルス（例えば、フィラメント様ファージ）は、細胞内でプラスミドと共に安定に存在し、そしてまた細胞から子孫ファージを押し出す。他のウイルス（例えば、コスミドゲノムを有する入）は、プラスミドのように、子孫ビリオンを産生することなく細胞中に安定に存在する。他のウイルス（例えば、Tファージおよび溶解性入）は、プラスミドとの組換えを受けるが、最終的には宿主細胞を殺しそしてプラスミドDNAを破壊する。宿主を殺すことなく細胞に感染するウイルスについては、組換えプラスミドおよびウイルスを含む細胞が、プラスミドープラスミド組換えと同様のアプローチを使用して、スクリーニング/選択され得る。選択/スクリーニングを生き残った細胞によって押し出された子孫ウイルスはまた、回収されそして組換えの次の回の基質として使用され得る。宿主細胞を殺すウイルスについては、組換えから得られた組換え遺伝子は、子孫ウイルスにのみ残る。スクリーニングまたは選択アッセイが、細胞内での組換え遺伝子の発現を必要とする場合、組換え遺伝子は、子孫ウイルスから他のベクター（例えば、プラスミドベクター）に移され、そして選択/スクリーニングが行われる前に、細胞に再トランスフェクトされなければならない。

【0281】フィラメント様ファージについては、組換えの産物は、組換えを生き残っている細胞およびこれらの細胞から押し出されたファージの両方に存在する。組換え産物の二元的な供給源は、プラスミドープラスミド組換えと比較して、いくつかのさらなる選択肢を提供する。例えば、DNAは、インビトロ組換えの回で使用するためにファージ粒子から単離され得る。あるいは、子孫ファージは、前の回のスクリーニング/組換えを生き残っている細胞、または組換えのために新鮮な基質でト

ランスフェクトされた新鮮な細胞を、トランスフェクトまたは感染するために使用され得る。1つの局面において、本発明は、一本鎖バクテリオファージおよび/またはファージミドのような複数の一本鎖種間での組換えを用いる。

【0282】図27は、ウイルスープラスミド組換えについてのスキームを例示する。パネルAは、プラスミドまたはウイルスベクターにクローニングした遺伝子の変異形態のライブラリーを示す。次いで、プラスミドを、パネルBに示すように、細胞に導入する。ウイルスゲノムは、インビトロでパッケージされ、そしてパネルBに示す細胞を感染させるために使用される。ウイルスゲノムは、パネルCに示すように、細胞内で複製され得る。ウイルスゲノムは、パネルDに示すプラスミドおよびウイルスの形態を生じるプラスミドゲノムでの組換えを受ける。プラスミドおよびウイルスゲノムの両方は、パネルEおよびFに示す構造を生じるさらなる回の複製および組換えを受け得る。スクリーニング/選択によって、パネルGに示すように、スクリーニング/選択プロセスでの細胞の生存を可能にするように最も良く進化した遺伝子を有するプラスミドおよび/またはウイルスゲノムを含む細胞が同定される。これらのウイルスゲノムはまた、この様な細胞に押し出されたウイルス中にも存在する。

【0283】(c) ウイルスーウイルス組換え
プラスミドープラスミド組換えおよびプラスミドーウイルス組換えについて記載した原理は、いくつかの改変を加えて、ウイルスーウイルス組換えに適用され得る。組換えのための最初の基質は、ウイルスベクターにクローニングされる。通常、全ての基質について同じベクターが使用される。好ましくは、ウイルスは、本来、または変異の結果、細胞を殺さないウイルスである。挿入後、ウイルスゲノムは、通常インビトロでパッケージされる。パッケージされたウイルスは、高多重度で細胞を感染するために使用され、従って、細胞が異なる基質を保有する複数のウイルスを受容する確率が高い。

【0284】初回の感染後の、次の工程は、前節で議論したような感染の性質に依存する。例えば、ウイルスが、λコスミドまたはM13、F1またはF_dファージミドのようなファージミドゲノムを有する場合、ファージミドは、細胞内でプラスミドのように挙動し、そして単に細胞を増殖させることによって組換えを受ける。組換えは、細胞内DNAの一本鎖の形態の間で特に有効である。組換えは、細胞のエレクトロポレーションによって増大され得る。選択/スクリーニングに続いて、組換え遺伝子を含むコスミドは、生き残っている細胞から（例えば、cos⁺溶原性宿主細胞の熱誘導によって）回収され、インビトロで再パッケージされ、そしてさらなる回の組換えのために高多重度で新鮮な細胞を感染させるために使用され得る。

【0285】ウイルスがフィラメント様ファージである場合、複製している形態のDNAの組換えは、感染させた細胞の培養物を増殖させることによって起こる。選択／スクリーニングによって、特性が改善された組換え遺伝子を有するウイルスベクターを、この様な細胞から押し出されたファージと共に含む細胞のコロニーが同定される。次の選択肢は、プラスミド-ウイルス組換えと本質的に同じである。

【0286】図28は、ウイルス-ウイルス組換えの例を示す。多様な遺伝子のライブラリーは、 λ コスミドにクローニングされている。組換えコスミドDNAは、インビトロでパッケージされ、そして高多重度で宿主を感染するために用いられ、その結果、異なる挿入片を保有する多くのコスミドが同じ細胞に入る。選択される細胞は、 cos^+ 溶原性であり、これは誘導の際に溶原性DNAをパッケージせずにコスミドDNAをパッケージする。コスミドは細胞内で組換わる。組換えは、Mut D、Mut S、Mut Lであるか、および／または改変 $recA$ を発現する宿主細胞の使用によって加速され得る。溶原性の誘導により、パッケージされたコスミド（これは、開始物質よりも多様性を有する）の放出が生じる。

【0287】(d) 染色体-プラスミド組換え

このフォーマットは、染色体およびプラスミドを保有する基質の両方を進化させるために使用され得る。このフォーマットは、多くの染色体遺伝子が表現型に寄与する状況、または進化させるべき染色体遺伝子の正確な位置が不明である状況で、特に有用である。組換えのための最初の基質が、プラスミドベクターにクローニングされる。進化させる染色体遺伝子が既知である場合、基質は、高い程度の配列同一性を示すが、染色体遺伝子由来のいくつかの多様性も示す配列のファミリーを構成する。進化させる染色体遺伝子が位置づけされていない場合、最初の基質は、通常、ごく少数のみしか進化させるべき遺伝子（単数または複数）に対する配列同一性を示さないDNAセグメントのライブラリーを構成する。プラスミド保有基質と染色体遺伝子（単数または複数）との間の多様性は、変異原誘発によって誘導され得るか、または染色体を保有する細胞の種とは異なる種から基質を保有するプラスミドを得ることによって誘導され得る。

【0288】組換えのための基質を保有するプラスミドは、進化させる染色体遺伝子（単数または複数）を有する細胞にトランスフェクトされる。進化は、単に培養物を増殖させることによって起こり得、そして接合またはエレクトロポレーションによって細胞間でプラスミドを移動させることによって加速され得る。進化は、ミューター宿主細胞の使用によって、またはミューター性宿主細胞で進化している非ミューター宿主細胞を播種しそしてエレクトロポレーションまたは接合によ

りプラスミドの細胞内転移を誘導することによって、さらに加速され得る。好ましくは、播種に用いられるミューター宿主細胞は、進化している非ミューター細胞の純粋な培養物の単離を容易にするために、ネガティブな選択マーカーを含む。選択／スクリーニングによって、所望の機能を獲得するように進化した染色体および／またはプラスミドを保有する細胞が同定される。

【0289】組換えおよび選択／スクリーニングの次の回は、プラスミド-プラスミド組換えについて記載した様式と同様の様式で進行する。例えば、さらなる組換えは、プラスミドのエレクトロポレーションまたは接合の転移と組み合わせ、組換えを生き残っている細胞を増殖させることによってなされ得る。あるいは、組換えのためのさらなる基質を保有するプラスミドが、生き残っている細胞に導入され得る。好ましくは、このようなプラスミドは、異なる不適合な群由来であり、そして元のプラスミドと異なる選択マーカーを保有し、少なくとも2つの異なるプラスミドを含む細胞の選択を可能にする。さらなる代替として、プラスミドおよび／または染色体DNAは、生き残っている細胞の部分集団から単離され、そして第2の部分集団にトランスフェクトされ得る。染色体DNAは、トランスフェクションの前に、プラスミドベクターにクローニングされ得る。

【0290】図29は、プラスミド-染色体シャッフリングのスキームを例示する。パネルAは、プラスミドベクターにクローニングされた遺伝子の変異形態を示す。プラスミドは、パネルBに示すように、細胞に導入される。細胞中で、プラスミドは、複製し、そしてパネルCに示すように、遺伝子の染色体コピーでの組換えを受ける。細胞間でのプラスミドの交換は、パネルDに示すように、エレクトロポレーションまたは接合によってなされ得る。パネルDに示す2つの細胞の染色体遺伝子は、異なる変異形態に進化している。スクリーニング／選択によって、パネルEに示すように、細胞がスクリーニング／選択を生き残る所望の特性を獲得するように進化した染色体遺伝子を保有する細胞が同定される。

【0291】(e) ウイルス-染色体組換え

上記の他の方法におけるように、ウイルスは、通常、細胞を殺すウイルスではなく、そしてしばしばファージまたはファージミドである。手順は、実質的にプラスミド-染色体組換えと同じである。組換えのための基質が、ベクター中にクローニングされる。次いで、基質を含むベクターが、細胞へトランスフェクトされるか、またはインビトロでパッケージされ、そして感染によって細胞に導入され得る。ウイルスゲノムは、単に培養物を増殖させることによって、宿主染色体と組換わる。進化は、エレクトロポレーションによるウイルスゲノムに細胞内で転移されることによって、または子孫ビリオンによる細胞の再感染によって、加速され得る。スクリーニング／選択によって、所望の特性を獲得するように進化した

染色体および/またはウイルスゲノムを有する細胞が同定される。

【0292】組換えの次の回について、いくつかの選択肢が存在する。例えば、ウイルスゲノムを、エレクトロポレーションによって選択/組換えを生き残っている細胞間を移動させ得る。あるいは、選択/スクリーニングを生き残っている細胞から押し出されたウイルスはプールされ、そして高多重度で細胞を重複感染させるために使用され得る。あるいは、組換えのための新鮮な基質が、プラスミドまたはウイルスベクターのいずれかで、細胞内に導入され得る。

【0293】e. 接合性転移による遺伝子の進化
上記のように、接合により細胞間のプラスミドの転移を可能にすることによって、プラスミドDNAのインビボでの進化の割合が加速され得る。接合は、細胞間の接触の間起こるDNAの転移である。Guiney (1993): *Bacterial Conjugation* (Clewel編, Plenum Press, New York), 75~104頁; Reimann および Hass, *Bacterial Conjugation* (Clewel編, Plenum Press, New York 1993), 137-188頁 (その全体が本明細書中で参考として援用される) を参照のこと。接合は、多くのタイプのグラム陰性細菌およびいくつかのタイプのグラム陽性細菌の間で起こる。接合性転移はまた、細菌と植物細胞 (*Agrobacterium tumefaciens*) または酵母との間でも知られている。同時係属中の出願の代理人番号16528J-014612に議論されるように、接合性転移を担う遺伝子は、そのような転移が生じ得る間の細胞型の範囲 (例えば、細菌から哺乳動物) に広がるように進化され得る。

【0294】接合性転移は、転移の起点 (*oriT*) および隣接する遺伝子 (MOB A, B, および C)、ならびに *tra* と呼ばれる接合を生じるために必要な構造および酵素をコードする15~25遺伝子から生じる。転移の起点は、DNA転移の *cis* において必要とされる部位として規定される。*tra* 遺伝子は、*tra* A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z, *vir* AB (対立形質1~11)、C, D, E, G, IHF, および *FinOP* を含む。*oriT* はまた、時に *tra* 遺伝子とも呼ばれる。他の細胞性酵素 (RecBCD経路の酵素、RecA、SSBタンパク質、DNAジャイレース、DNApol I, および DNAリガーゼを含む) もまた、接合性転移に関与する。*recE* または *recF* 経路が、RecBCDを置換し得る。

【0295】*tra* 遺伝子および MOB 遺伝子は、*oriT* に対して *cis* または *trans* で発現され得る。

接合を受けているベクターはまた、不適合性群 (例えば、Inc A, B, C, D, E, F, (I~VI)、H (I, Y)、i (1, 2, 5, α)、J, K, L, M, N, P (α , β , 1 α , 3, 7, 10, 13) Q, R (H1, H2, H3)、S, T, U, W, X, Z) に属するとして分類される複製起点を有する。異なる不適合性群由来のベクターのみが、同じ細胞内で安定に共存し得る。しかし、同じ不適合性群由来の2つのベクターが同じ細胞にトランスフェクトされる場合、ベクターは、このベクター間で組換えが生じ得るに十分な時間、一過性に共存する。

【0296】*tra* 遺伝子にコードされる1つの構造タンパク質は6本の纖毛 (細胞の表面から突き出ている単一のポリペプチドの集合で構築されるフィラメント) である。6本の纖毛は、レシビエント細胞上の多糖に結合し、そして接合性架橋 (*conjugative bridge*) (これを通してDNAが転移し得る) を形成する。この過程で、MOB 遺伝子にコードされる部位特異的ヌクレアーゼが活性化される。これは、*oriT* で転移されるべきDNAを特異的に切断する。次いで、切断されたDNAは、他の *tra* 酵素の作用によって接合性架橋を通る。

【0297】DNAは、可動性ベクターの成分として存在する場合、細胞間をより有効に移動する。しかし、いくつかの可動性ベクターは、宿主染色体に組み込み、そしてそれによって染色体から隣接する遺伝子を移動させる。例えば、*E. coli* の F プラスミドは、高頻度で染色体に組み込み、そして組み込みの部位から遺伝子を一方向的に移動させる。他の可動性ベクターは、自発的に高頻度で宿主染色体に組み込まないが、特定の条件 (例えば、変異原性薬剤での処置、プラスミド複製ができない温度での増殖) 下での増殖によって、そのように誘導され得る。Reimann および Haas, *Bacterial Conjugation* (編Clewel, Plenum Press, NY 1993) 第6章を参照のこと。

【0298】接合は、遺伝子の多様な組換え形態を生成するためにインビボで遺伝子を組み換える手段を提供する。反復組換えの他の方法のように、組換えおよび選択/スクリーニングの相互作用的サイクルを用いて、新規のまたは改善された特性を獲得するように遺伝子を進化させ得る。反復組換えの任意の方法のように、第1の工程は、進化させるべき遺伝子 (単数または複数) の多様な形態のライブラリーを生成するためのものである。多様な形態は、天然の多様性、伝統的な変異誘発方法 (例えば、誤りがちなPCRまたはカセット変異誘発) の適用の結果であり得るか、またはこの適用で議論された任意の他の組換えフォーマットの結果であり得るか、またはこれらの任意の組合せであり得る。多様な形態の数は、約10~100、10⁴、10⁶、10⁸、または1

0¹⁰まで、広範に変化し得る。しばしば、目的の遺伝子（単数または複数）は、別個のユニットとして変異誘発される。しかし、遺伝子（単数または複数）の位置が未知である場合または多数の遺伝子が同時に進化する場合、最初多様性は、遺伝子（単数または複数）を含む染色体のインサイチュ変異誘発によって生じ得る。

【0299】遺伝子（単数または複数）の多様な形態のライブラリーは、通常遺伝子が発現され得るような配置で、接合性転移に必要な装置を含む細胞（ライブラリーはまだこのような細胞に含まれていないと仮定する）に導入される。例えば、遺伝子（単数または複数）がプロモーターのような必須の調節配列の非存在下で変異誘発される場合、これらの配列は、細胞への導入の前に再付着される。同様に、遺伝子のフラグメントが単離された状態で変異誘発される場合、変異誘発産物は、通常細胞へ導入される前に、変化していない隣接配列と再度結合される。接合性転移に必要な装置は、その発現が接合性転移を生じるために必要であるmobおよびtra遺伝子と共に転移の起点を有するベクターを含む。これらの遺伝子は、ベクター、1つ以上の異なるベクター、または染色体に含まれ得る。進化させるべき多様な形態の遺伝子のライブラリーは、通常転移の起点を含むベクターに挿入される（図30を参照のこと）。しかし、いくつかの状況において、多様な形態の遺伝子のライブラリーは、染色体または第2のベクター中に存在し得るか、または転移の起点を含むベクター中の代わりに存在し得る。多様な形態のライブラリーは、異なる細胞の異なる位置に挿入され得る。

【0300】種々の形態のライブラリーを保有するベクターは、少なくとも1つの複製起点を含む。異なる細胞タイプ間の転移が意図される場合、ベクターは、2つの複製起点（1つは各細胞タイプで機能的である（すなわち、シャトルベクター））。あるいは、転移された遺伝子がレシビエント細胞の染色体に組み込むことを意図する場合は、ベクターは、レシビエント細胞で機能的である複製起点を含まない（すなわち、自殺ベクター）ことが好ましい。oriT部位および/またはMOB遺伝子は、RK2/RP4 MOB機能をクローニングまたは置き換えることによって（Guiney, J. Mol. Biol. 162, 699-703 (1982)）、またはMOB含有プラスミドとの同時組み込み形成によって、ベクターに導入され得る。大きなプラスミドについて便利な方法は、「Tn5-Mob」の使用である。Tn5-Mobは、RP4のoriTを含むTn5トランスポゾンである。例えば、pUC様可動性ベクターpK18およびpK19（Schaeferら、(1995) Gene 145:69-73）は、進化させるべきtra遺伝子ライブラリーの適切な開始クローニングベクターである。

【0301】必要ではないが、組換えは、時に、多様な

遺伝子ライブラリーを、異なる不適合性起点を有する異なる種類の2つのベクターに挿入することによって容易にされる。各ベクターはoriTを含むはずであり、そして細胞は、両方のベクターの可動化に適したMOBおよびtra機能を発現するはずである。2つのこのような種のベクターの使用により、同じ細胞内での複数のベクターの安定な共存が可能であり、そしてベクター間の組換えの効率が增大する。

【0302】細胞の収集物は、遺伝子が発現させるために任意の適切な培地中で増殖される。traおよびmob遺伝子は発現され、そして細胞間での可動性ベクターの転移を媒介する。多様なライブラリーが、可動性ベクターにクローニングされ、そのメンバーは、ベクターの成分として転移される。多様なライブラリーまたはライブラリーの特定のエレメントが可動性ベクターに対してトランスで存在する場合、可動性ベクターがこのエレメントに組み込むかまたはこれに近くなる場合にのみこれらは転移される。上記のように、組み込み頻度がE.coliのFプラスミドについて自然に起こり、そして他の可動性ベクターについて誘導され得る。

【0303】細胞間の多様なライブラリーのメンバーの転移の結果として、細胞のいくつかは、多様なライブラリーのメンバーの1つ以上を含むようになる。複数のメンバーが、組換え形態のライブラリーにおいてなおさらなる多様性を生じるこのような細胞内での組換えを受ける。一般に、細胞がより長く増殖されればされるほど、組換え形態がより多く生じる。一般に、組換えにより同じ細胞内に1つ以上の組換え産物が生じる。両方の組換え産物がベクター上にあり、そしてベクターが同じ不適合性群由来である場合、ベクターの1つは、細胞が増殖するにつれて失われる。このプロセスは、組換え産物のどちらか一方が選択の利点を付与する選択培地上で細胞が増殖される場合により速く起こる。組換えの適切な期間（これは細胞タイプおよびその増殖周期時間に依存する）後、組換え形態は、スクリーニングまたは選択に供される。組換え形態がすでに細胞内に存在するので、組換えのこのフォーマットは、インビボスクリーニングまたは選択の周期との交替を特に受けやすい。もちろん、スクリーニングまたは選択の条件は、遺伝子（単数または複数）が進化して獲得するかまたはそれにおいて改善されることが所望される特性に依存する。例えば、特性が薬物耐性である場合、最も良好な薬物耐性を有する組換え形態が、薬物への曝露によって選択され得る。あるいは、遺伝子のクラスターが進化して2次代謝産物としての薬物を産生する場合、遺伝子の組換えクラスターを保有する細胞は、組換えクラスターを保有する細胞のコロニーを薬物に感受性である細胞の芝生（lawn）で覆うことによってスクリーニングされ得る。最良の薬物を産生する組換えクラスターを有するコロニーは芝生の穴から同定される。遺伝子が増殖特徴の増強を付与する

ように進化している場合、最良の遺伝子を保有する細胞は、増殖競争によって選択され得る。抗生物質産生は、細胞が増殖について他の細胞タイプと競争する場合、増殖速度の利点であり得る。選択／スクリーニングによって、所望の特性を獲得するように進化した遺伝子（単数または複数）の組換え形態を発現するサブ集団が産生される。これらの組換え形態は、次いで、任意の順で、組換えおよびスクリーニング／選択のさらなる回に供され得る。例えば、2回目のスクリーニング／選択は、一回目と同様に行われ得、所望の特性を獲得するように進化した遺伝子をさらに豊富にする。必要に応じて、選択のストリンジENCYは、各回の間で増加され得る（例えば、薬物耐性について選択する場合、培地中の薬物の濃度が増大され得る）。組換えのさらなる回はまた、一回目と同様のストラテジーによって行われ得、遺伝子（単数または複数）のさらなる組換え形態を生成する。あるいは、組換えのさらなる回は、議論した任意の他の分子交配（molecular breeding）フォーマットによって行われ得る。最終的に、所望の特性を十分に獲得した遺伝子（単数または複数）の組換え形態が生成される。

【0304】図30は、薬物耐性遺伝子が接合性転移によってどのように進化し得るかの例を提供する。パネルAは、ori Tを保有している可動性ベクターにクローニングされた多様な遺伝子のライブラリーを示す。このベクターは、tra機能を提供する第2のベクターを含む細胞に存在する。接合性転移によって、細胞間可動性ベクターが移動し、その結果、パネルBに示すように、異なる変異形態の遺伝子を保有する異なるベクターが同じ細胞を占拠する。遺伝子の異なる形態は組換えによってパネルCに示す産物を生じる。接合および組換えを所望の期間進行させた後、細胞は、パネルDに示すように、組み換えられた遺伝子を含む細胞を同定するために選択される。

【0305】1つの局面において、別のシャッフリング法は、プラスミド内の組換えの使用を包含し、ここで、配列組換えポリヌクレオチド配列のライブラリーは、同じプラスミド上に位置する直接配列反復のインビボでの遺伝子組換えによって得られる。改変において、組み換えられるべき配列は、部位特異的組換え配列に隣接し、そしてポリヌクレオチドは部位特異的組換え系（例えば、インテグロン（HallおよびCollins（1995）Mol. Microbiol. 15: 593、本明細書中で参考として援用される））に存在する。

【0306】本発明の1つの局面において、宿主細胞のミューテーター株を使用して、より高度にミスマッチした配列間連ポリヌクレオチドの組換えを増強する。MutL、MutS、またはMutHのような細菌株、あるいはMutタンパク質を発現する他の細胞（XLR

ed; Stratagene, San Diego, CA）が、インビボ組換えによる配列間連ポリヌクレオチドのシャッフリングのための宿主細胞として使用され得る。他の変異傾向の宿主細胞タイプ（例えば、ブルーフリーディング欠損ポリメラーゼを有する細胞 Fosterら、（1995）Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 92: 7951、本明細書中で参考として援用される）もまた、使用され得る。他のインビボ変異誘発フォーマットが使用され得、宿主細胞に化学的変異原または放射線学的変異原を投与する工程を包含する。このような変異原の例として、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ENU、MMNG、ニトロソ尿素、BuDRなど。

【0307】シャッフリングを用いて、PCRまたはPCR様増幅反応において塩基のアナログを取り込み得るポリメラーゼを進化させ得る。塩基アナログを使用するように進化させられるDNAポリメラーゼを用いて、PCRによって、質量分析DNA配列決定のような質量分析においてより合理的なフラグメント化パターンをもたらす化学的形態にDNAをコピーし得る。塩基アナログは、より少ないおよび／またはより多い好ましいフラグメント部位を有して、質量分析パターンの解釈を増強するかまたは容易にし得る。

【0308】改変ポリメラーゼはまた、反復的な配列組換えによって進化させられて、非天然ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログ（例えば、ホスホロチオエートヌクレオチド）を取り込み得る。このような改変ポリメラーゼで作製されたホスホロチオエートヌクレオチドは、多くの用途（ヌクレアーゼ分解に耐性の裸のDNA遺伝子治療ベクターを含む）を提供する。反復配列組換えを介して改変され得るポリメラーゼの特性の他の例として、以下が挙げられるが、これらに限定されない：特に、処理性（processivity）、エラー率、ブルーフリーディング、熱安定性、酸化耐性、ヌクレオチド優先性、テンプレート特異性など）。

【0309】1つの実施態様において、蛍光活性化細胞ソーティングまたは類似の方法論は、反復して組み換えられた配列のライブラリーのライブラリーメンバーを含む宿主細胞（代表的には哺乳動物細胞、昆虫細胞、または細菌細胞）をスクリーニングするために使用される。ここで、所望の表現型を付与するライブラリーメンバーを有する宿主細胞は、1つ以上の検出波長での蛍光または光学的密度に基づいて選択され得る。例えば、1つの実施態様において、各ライブラリーは、代表的には、酵素（これは、細胞から分泌され得るかまたは細胞内であり得る）をコードし、そしてこの酵素は染色体または蛍光原性基質（これは、宿主細胞内に分散され得る）の転換を触媒する（例えば、この酵素が分泌されない場合）。ライブラリーメンバーを含む宿主細胞は、液体の

滴またはゲルの滴に含まれ、そして検出装置を通過する。ここでこの滴は励起波長で照射され、そして検出器は蛍光放出波長照射を測定するか、および／または1つ以上の励起的波長での光学密度(吸光度)を測定するかのいずれかである。滴に懸濁された細胞は、約1個だけの個々の細胞が一回にサンプル検出領域に存在するような条件下で、サンプル検出器を通過する。光源は、各細胞および検出器(代表的には光増幅器または発光ダイオード)を照射し、放出された照射を検出する。検出器は、検出されるシグナル(単数または複数)に基づいて、検出領域における細胞の、複数のサンプル収集領域の1つへ細胞が入るのを制御する。 米国特許第4, 172, 227号; 同第4, 347, 935号; 同第4,

ml	=	ミリリットル
μ l	=	マイクロリットル
μ M	=	マイクロモル濃度
nM	=	ナノモル濃度
PBS	=	リン酸緩衝化生理食塩水
ng	=	ナノグラム
μ g	=	マイクログラム
IPTG	=	イソプロピルチオ- β -D-ガラクトシド
bp	=	塩基対
kb	=	キロ塩基対
dNTP	=	デオキシヌクレオシド3リン酸
PCR	=	ポリメラーゼ連鎖反応
X-gal	=	5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド
DNAse I	=	デオキシリボヌクレアーゼ
PBS	=	リン酸緩衝化生理食塩水
CDR	=	相補性決定領域
MIC	=	最小阻止濃度
scFv	=	抗体の単鎖Fvフラグメント。

【0311】

【実施例】一般に、組換えDNA工学の標準的な技術は、種々の出版物(例えば、Sambrookら、1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory; Ausubelら、1987, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1巻および2巻ならびに増補、ならびにBergeryおよびKimmel, *Methods in Enzymology*, 152巻, *Guide to Molecular Cloning Techniques* (1987), Academic Press, Inc., San Diego, CA, それぞれ参考として全体が本明細書中に援用される)に記載されている。制限酵素およびポリヌクレオチド修飾酵素を、製造業者の推奨に従って用いた。オリゴヌクレオチドをApplied Biosystems Inc.

661, 913号; 同第4, 667, 830号; 同第5, 093, 234号; 同第5, 094, 940号; および同第5, 144, 224号に提供されるFACS装置および方法の一般的な記載は、本明細書中で参考として援用される。従来のFACSの適切な代替は、One Cell Systems, Inc. Cambridge, MAから入手可能である。上記から認識され得るように、本発明は、広範な適用を有する。従って、以下実施例は、限定のためでなく、例示のために提供される。

【0310】以下の実施例において、以下の略語は以下の意味を有する。以下に定義されない場合、その略語は当該分野で理解される意味を有する。

Model 394 DNA合成機で、ABIの化学製品を用いて合成した。所望であれば、予め決定されたDNA配列を増幅するためのPCRアンプリマー(amp limer)は、従事者の判断で選択され得る。

【0312】(実施例1. LacZ α 遺伝子の再組立)

1) 基質の調製

再組立反応のための基質は、pUC18由来の野生型LacZ α 遺伝子のdsDNAポリメラーゼ連鎖反応(「PCR」)産物であった(図2)(28; Gen Bank第X02514号)。プライマー配列は、5' AAAGCGTCGATTTTGTGAT3' (配列番号1)および5' ATGGGGTTCCGCGCACATTT3' (配列番号2)であった。遊離したプライマーを、製造業者の指示に従い、Wizard PCR prep (Promega, Madison WI)によりPCR産物から除去した。遊離したプライマーの除去は、重要であることが見出された。

【0313】2) DNase I消化

約5 μ gのDNA基質を、10～20分間室温にて、100 μ lの[50mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM MgCl₂]中で、0.15単位のDNase I (Sigma, St. Louis MO)で消化した。消化されたDNAを、2%低融点アガロースゲルで泳動した。10～70塩基対(bp)のフラグメントを、DE81イオン交換紙(Whatman, Hillsborough OR)上への電気泳動により2%低融点アガロースゲルから精製した。DNAフラグメントを、1M NaClを用いてこの紙から溶出してエタノール沈澱した。

【0314】3) DNA再組立

精製されたフラグメントを、PCR Mix (0.2mM 各dNTP, 2.2mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH9.0, 0.1% Triton X-100, 0.3 μ l Taq DNAポリメラーゼ, 50 μ lの総容量)中に10～30ng/ μ lの濃度で再懸濁させた。この時点では、プライマーを添加しなかった。94℃60秒間、[94℃30秒間、50～55℃30秒間、72℃30秒間]の30～45サイクル、および72℃5分間の再組立プログラムを、MJ Research (Watertown MA) PTC-150サーマルサイクラーにおいて用いた。より大きな配列への小さなフラグメントのPCR再組立に続いて、再組立の25、30、35、40、および45サイクル後の反応のサンプルを採取した(図2)。

【0315】100～200bpのフラグメントの再組立は、正確なサイズの単一のPCR産物を産生し得るが、10～50塩基のフラグメントは、代表的に正確なサイズのいくらかの産物および不均一な分子量の産物を産生する。制限酵素消化後、正確なサイズの単一のバンドが得られるので、このサイズ不均一性のほとんどは、産物の末端での1本鎖配列に起因すると思われる。

【0316】4) プライマーを用いたPCR

それぞれ0.8 μ Mの上記のプライマー(配列番号1お

よび2)を有するPCR Mixへの再組立産物の希釈、および約15サイクルのPCR(それぞれのサイクルは、[94℃30秒間、50℃30秒間、および72℃30秒間]からなる)の後、正確なサイズの単一の産物が得られた(図2)。

【0317】5) クローニングおよび分析

上記の工程4由来のPCR産物を、末端の制限酵素BamHIおよびEcoO109で消化し、そして上記の工程2に記載のようにゲル精製した。再組立されたフラグメントを、BamHIおよびEcoO109で消化したpUC18に連結した。E. coliを、製造業者(Stratagene, San Diego CA)により推奨されるような標準的な条件下で、この連結混合物を用いて形質転換し、そして100 μ g/mlアンピシリン、0.004% X-galおよび2mM IPTGを有するアガープレートに播いた。++組換え体と判定されるHindIII-NheIフラグメントを有する得られたコロニーを、それが青く見えることにより同定した。

【0318】この実施例は、LacZ α 遺伝子を保有する1.0kbの配列が、10～70bpのフラグメントに消化され得ること、およびこれらのゲル精製された10～70bpのフラグメントが、正確なサイズの単一の産物に再組立され得ることを説明する。ここで、得られたコロニーの84%(N=377)がLacZ⁺である(シャッフリングなしの場合の94%に対して;図2)。

【0319】得られたLacZ⁺コロニー由来のLacZ遺伝子をコードするDNAを、製造業者の指示に従い、配列決定キット(United States Biochemical Co., Cleveland OH)で配列決定し、そしてこの遺伝子が、再組立プロセスに起因する点変異を有することを見出した(表1)。11/12の型の置換が見い出され、そしてフレームシフトは見い出されなかった。

【0320】

【表1】

変異誘発シャッフリングにより誘導された変異

トランズジョン	頻度	トランスバージョン	頻度
G - A	6	A - T	1
A - G	4	A - C	2
C - T	7	C - A	1
T - C	3	C - G	0
		G - C	3
		G - T	2
		T - A	1
		T - G	2

【0321】シャッフリングされたLacZ DNAの全体の4,437塩基を配列決定した。

【0322】10～70bpの切片からのDNA再組立の間の点変異誘発率は、DNA配列決定から0.7%(N=4,473)であると決定された。これは誤りが

ちなPCRと類似している。いかなる理論にも制限されることなく、より大きなフラグメントが再組立に用いられる場合、または校正ポリメラーゼが添加される場合、点変異誘発率は、より低くあり得ると考えられている。

【0323】14のこれらの点変異されたLacZ⁺コ

ロニー由来のプラスミドDNAを、組合わせ、そして再び上述の方法により再組立/シャッフリングした場合、得られたコロニーの34% (N=291) がLacZ⁺であり、そしてこれらのコロニーは、おそらく異なるコロニー由来のDNAの組換えにより生じたのであろう。

【0324】誤りがちなPCRによる単一の点変異の予測される回復率は、変異誘発率が0.7% (10) であると仮定すると、<1%であると予想される。

【0325】このようにして、大きなDNA配列は、驚くほど効率的および単純な反応により、小さなフラグメントのランダムな混合物から再組立され得る。この技術の1つの応用は、相同性に基づいた関連した配列の組換えまたはシャッフリングである。

【0326】(実施例2. LacZ遺伝子およびプラスミドDNA全体のシャッフリング)

1) LacZ遺伝子シャッフリング

2つのLacZ遺伝子構築物を用いて、75塩基離れた2つのマーカー間の交差を計測した。終止コドン、LacZ α 遺伝子の2つの離れた範囲に挿入し、ネガティブマーカーとして用いた。それぞれのマーカーは、4つの終止コドンを有する25bpの非相同配列であり、終止コドンのうち2つは、LacZ遺伝子のリーディングフレーム内にある。25bpの非相同配列を、大きな四角により図3に示す。終止コドンは、四角で囲むか、または下線を付すかした。+および-型のLacZ α 遺伝子(図3)を含有する2つの1.0kbのLacZテンプレートの1:1混合物を、DNase Iで消化し、そして100~200bpのフラグメントを実施例1に記載のように精製した。シャッフリングプログラムを、0.5 μ lのポリメラーゼを添加し、そして全容量が100 μ lであった以外は、実施例1における再組立について記載された条件と同様の条件下で実施した。

【0327】クローニング後、得られた青色のコロニーの数は、24% (N=386) であった。これは青色のコロニーの理論的な最大数(すなわち25%)に近接しており、2つのマーカー間の組換えが完全であったことを示した。10の青色のコロニーの全ては、予測されるHindIII-NheI制限フラグメントを含有した。

2) プラスミドDNA全体のシャッフリング

2.7kbプラスミド全体(pUC18-+およびpUC18-)もまた、試験した。+および-型のLacZ α 遺伝子(図3)を含有する2つの2.9kbのプラスミドの1:1混合物を、DNase Iで消化し、そして100~200bpのフラグメントを実施例1に記載のように精製した。プログラムが[94℃30秒間、55℃30秒間、72℃30秒間]の60サイクルであった以外は、上記の工程(1)における再組立について記載された条件と同様の条件下でシャッフリングプログラムを実施した。ゲル分析は、シャッフリングプロ

グラム後、産物のほとんどが20kbよりも大きいことを示した。このようにして、2.7kbのプラスミド全体(pUC18-+およびpUC18-)を、プライマーの添加なしにランダムな100~200bpのフラグメントから効率的に再組立した。

【0328】プラスミド上に唯一の部位を有する制限酵素(EcoO109)での消化後、産物のほとんどは、予測されるサイズの単一のバンドからなっていた。このバンドをゲル精製し、再連結し、そしてこのDNAをE. coliの形質転換に用いた。実施例1に記載のように、形質転換体を0.004% X-galプレート上に播いた。得られたプラスミドの11% (N=328) は、青色すなわち++組換え体であった。

【0329】3) スパイクしたDNAシャッフリング シャッフリング混合物中に混合されるオリゴヌクレオチドは、テンプレートDNAに対するオリゴヌクレオチドのランキン配列の相同性に基づき最終産物中に取り込まれ得る(図4)。上述のLacZ-終止コドン変異体(pUC18-)をDNase I消化テンプレートとして用いた。両末端に野生型LacZ遺伝子に対する18塩基の相同性を含有する66量体のオリゴヌクレオチドを、4倍モル濃度過剰量で反応物中に添加し、本家の遺伝子中に存在する終止コドン変異を補正した。シャッフリング反応を、上記の工程2における条件と同様の条件下で実施した。得られた産物を消化し、連結し、そして上述のようにE. coliに挿入した。

【0330】

【表2】

	青色コロニーの%
コントロール	0.0 (N>1000)
上部鎖スパイク	8.0 (N=855)
下部鎖スパイク	9.3 (N=620)
上部鎖および下部鎖スパイク	2.1 (N=537)

【0331】ssDNAは、dsDNAよりも効率的であるようであり、おそらくこれは競合的なハイブリダイゼーションに起因すると思われる。取り込みの度合は、モル濃度過剰量、アニーリング温度、または相同性の長さを調整することにより、広範な範囲に亘って変化し得る。

【0332】(実施例3. プライマーの完全な非存在下におけるDNA再組立) プラスミドpUC18を制限酵素EcoRI、EcoO109、XmnI、およびAlwNIで消化し、約370、460、770、および1080bpのフラグメントを産生した。これらのフラグメントを電気泳動し、そして2%低融点アガロースゲルから別々に精製した(370塩基対のバンドと460塩基対のバンドは、分離されなかった)。これにより、3つの別個のチューブに、大きなフラグメント、中程度のフラグメント、および2つの小さなフラグメント

の混合物を得た。

【0333】それぞれのフラグメントを実施例1に記載のようにDNAse Iで消化し、そして50～130bpのフラグメントを、それぞれの本来のフラグメントについて2%低融点アガロースゲルから精製した。

【0334】PCR混合物(上述の実施例1に記載のような)を精製した消化フラグメントに添加して、フラグメントの最終濃度を10ng/μlとした。プライマーを添加しなかった。再組立反応を、3つの消化したDNAフラグメント混合物それぞれについて別々に[94℃30秒間、60℃30秒間]を75サイクル実施し、そして産物をアガロースゲル電気泳動により分析した。

【0335】この結果は、1080bp、770bp、ならびに370bpおよび460bpのバンドが、精製されたフラグメントから効率的に再形成されたことを明確に示した。これは、シャッフリングがいかなるプライマーの使用をも全く必要としないことを示す。

【0336】(実施例4. IL-1β遺伝子シャッフリング) この実施例は、15塩基よりも少ない相同性に基づいて交差が得られ得ることを説明する。例として、ヒトおよびマウスのIL-1β遺伝子をシャッフリングした。

【0337】マウスのIL-1β遺伝子(BBG49)およびE. coliのコード使用頻度を有するヒトIL-1β遺伝子(BBG2; R&D Systems Inc., Minneapolis MN)をシャッフリング反応のテンプレートとして用いた。ヒトIL-1β配列とマウスIL-1β配列との間の完全に相同な範囲は、平均してわずか4.1塩基の長さである(図5、非相同の領域を四角で囲った)。

【0338】それぞれの遺伝子のdsDNA PCR産物の調製、プライマーの除去、10～50bpフラグメントのDNAse I消化および精製は、実施例1において上述されたものと同様であった。PCR反応に用いられるプライマーの配列は、5' TTAGGCACCCCAGGCTTT3' (配列番号3) および5' ATGTGCTGCAAGGCGATT3' (配列番号4) であった。

【0339】シャッフリング反応の最初の15サイクルは、DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントを用いて、それぞれのサイクル毎に1単位の新たな酵素を添加しながら、実施した。DNAを、混合物がポリメラーゼを含まない実施例1のPCR混合物に添加した。手動のプログラムは、94℃1分間、および次いで[95℃1分間、ドライアイス/エタノール上に10秒間(凍結するまで)、25℃にて約20秒間インキュベート、1UのKlenowフラグメントの添加、および25℃にて2分間インキュベート]の15サイクルであった。変性工程後のそれぞれのサイクルにおいて、チューブをドライアイス/エタノール中で迅速に冷却し、そし

てアニール温度まで再加熱した。次いで、熱不安定性ポリメラーゼを添加した。この酵素は、全てのサイクルごとの添加を必要とする。このアプローチを用いることにより、わずかに数塩基の連続した相同性に基づいて、高レベルの交差が得られた(図5、交差の位置を

【0340】

【化1】

「—|—」

【0341】で示す)。

【0342】これらの15回の手動のサイクルの後、Taqポリメラーゼを添加し、そしてさらなる22サイクルのシャッフリング反応[94℃30秒間、35℃30秒間]をプライマーなしで実施した。

【0343】次いで反応物を20倍に希釈した。以下のプライマーを、0.8μMの最終濃度で添加した: 5' AACGCCGCATGCAAGCTTGATCCTTATT3' (配列番号5) および5' AAAGCCCTCTAGATGATTACGAATTCATAT3' (配列番号6)。そしてPCR反応を実施例1における上述のように実施した。第2のプライマーペアは、制限部位の変化が必要であると考えられるためだけで第1のペアと異なった。

【0344】XbaIおよびSphIでのPCR産物の消化の後、このフラグメントをXbaI-SphI消化pUC18に連結した。いくつかのコロニー由来の挿入物の配列を、製造業者の指示に従い、ジデオキシDNA配列決定キット(United States Biochemical Co., Cleveland OH)により決定した。

【0345】全部で17の交差が、9つのコロニーのDNA配列決定により見い出された。いくつかの交差は、わずかに1～2塩基の連続した相同性に基づいていた。

【0346】短い相同性に基づく効率的な交差を強いるために、非常に低い効率的なアニーリング温度が要求されることが見い出された。任意の熱安定性ポリメラーゼを用いて、PCR機械の冷却時間(1～2℃/秒の94℃から25℃への)は、効果的なアニーリング温度を設定されたアニーリング温度よりも高くする。従って、Taqポリメラーゼに基づくプロトコルのいずれもが、IL-1β遺伝子の一方の10倍過剰量を用いても交差を産生しなかった。対照的に、熱不安定性ポリメラーゼ(例えば、DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメント)は、低いアニーリング温度を正確に得るために用いられ得る。

【0347】(実施例5. TEM-1βラクタマーゼ遺伝子のDNAシャッフリング) 直接分子進化のための変異誘発DNAシャッフリングの利用性を、βラクタマーゼモデルシステムにおいて試験した。TEM-1βラクタマーゼは、非常に効率的な酵素であり、主に拡散によりその反応速度は限定される。この実施例は、その反応

特異性を変化すること、および通常加水分解しない薬物セフトキシムに対して耐性を得ることが可能であるかを決定する。

【0348】プラスミドを欠く細菌性細胞におけるセフトキシムの最小阻止濃度 (MIC) を、E. coli XL1-blue 細胞 (Stratagene, San Diego CA) の一夜細菌培養物の 10^{-2} 希釈の $10 \mu\text{l}$ (約 1000 cfu) を、異なるレベルのセフトキシム (Sigma, St. Louis MO) を有するプレートに播き、続いて 37°C で 24 時間インキュベートすることにより決定した。

【0349】セフトキシム上での生育は、細胞の密度に対して敏感であり、それ故類似の数の細胞がそれぞれのプレートに播かれる必要がある (添加物非含有 LB プレートに播くことにより得られる)。1000 個の細胞のプレートが一貫して行われた。

【0350】1) 最初のプラスミド構築

細菌の TEM-1 β ラクタマーゼ遺伝子を保有する pUC18 誘導体を用いた (28)。TEM-1 β ラクタマーゼ遺伝子は、細菌に約 $0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$ のセフトキシムに対する耐性を与える。2つのプライマー:

プライマー A (配列番号 7):

5' TTCTATTGACGGCCTGTCAGGCC
TCATATATACTTTAGATTGATTT3'
およびプライマー B (配列番号 8):

5' TTGACGCACTGGCCATGGTGGCC
AAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGC
GCACATTT3'

を用いるベクター配列の PCR および 2つの他のプライマー:

プライマー C (配列番号 9):

5' AACTGACCACGGCCTGACAGGCC
GGTCTGACAGTTACCAATGCTT、および

プライマー D (配列番号 10):

5' AACCTGTCCTGGCCACCATGGCC
TAAATACATTCAAATATGTAT

を用いる β ラクタマーゼ遺伝子配列の PCR により、プロモーターの 5' および遺伝子の末端の 3' に SfiI 制限部位を付加した。

【0351】2つの反応産物を SfiI で消化し、混合し、連結し、そして細菌を形質転換するために用いた。

【0352】得られたプラスミドは、pUC182SfiI であった。このプラスミドは、TEM-1 遺伝子および P-3 プロモーターを保有する SfiI フラグメントを含有する。

【0353】このプラスミドを保有する E. coli XL1-blue (Stratagene, San Diego CA) に関するセフトキシムの最小阻止濃度は、 37°C で 24 時間後で $0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$ で

あった。

【0354】シャッフリングなしに、セフトキシムに対する β ラクタマーゼ遺伝子の耐性を改変する能力は、2倍に増加した薬物レベルへの細胞 (約 10^7 cfu) の希釈したプールの段階的な再プレートにより決定した。1. $28 \mu\text{g}/\text{ml}$ までへの耐性がシャッフリングなしに得られ得た。これは、耐性の 64 倍の増加を表す。

【0355】2) DNaseI 消化

第1のシャッフリング反応のための基質は、プライマー C および D (両方とも SfiI 部位を含有する) を用いる pUC182SfiI の PCR により得られた 0.9 kb の dsDNA であった。

【0356】各サイクルごとに PCR 産物から遊離プライマーを Wizard PCR prep (Promega, Madison WI) により除去した。

【0357】約 $5 \mu\text{g}$ の DNA 基質を、10 分間室温で、 $100 \mu\text{l}$ の 50 mM Tris-HCl pH 7.4、 1 mM MgCl_2 中で 0.15 単位の DNaseI (Sigma, St. Louis MO) で消化した。100~300 bp のフラグメントを、DE81 イオン交換紙 (Whatman, Hillsborough OR) への電気泳動、 1 M NaCl での溶出、およびエタノール沈澱により、実施例 1 に記載の方法によって 2% 低融点アガロースゲルから精製した。

【0358】3) 遺伝子シャッフリング

精製したフラグメントを、 $10 \sim 30 \text{ ng}/\mu\text{l}$ の濃度で PCR 混合物 (0.2 mM 各 dNTP、 2.2 mM MgCl_2 、 50 mM KCl、 10 mM Tris-HCl pH 9.0、 0.1% Triton X-100) に再懸濁した。この時点でプライマーを添加しなかった。 94°C 60 秒間、次いで [94°C 30 秒間、 $50 \sim 55^\circ\text{C}$ 30 秒間、 72°C 30 秒間] の 40 サイクル、そして次いで 72°C 5 分間の再組立プログラムを、MJ Research (Watertown MA) PTC-150 サーマルサイクラーにおいて使用した。

【0359】4) プライマーを用いる再組立産物の増幅 $0.8 \mu\text{M}$ のそれぞれのプライマー (C および D) を有する PCR 混合物への再組立産物の希釈、および 20 の PCR サイクル [94°C 30 秒間、 50°C 30 秒間、 72°C 30 秒間] の後、900 bp のサイズの単一の産物を得た。

【0360】5) クローニングおよび分析

末端の制限酵素 SfiI での 900 bp 産物の消化、およびアガロースゲル精製の後、900 bp 産物を、T4 DNA リガーゼ (BRL, Gaithersburg MD) を用いて唯一の SfiI 部位でベクター pUC182SfiI に連結した。混合物を、E. coli XL1-blue 細胞にエレクトロポレートし、そして $0.32 \sim 0.64 \mu\text{g}/\text{ml}$ のセフトキシム (S

igma, St. Louis MO)を有するLBプレートに播いた。細胞を、37℃で24時間まで増殖させ、得られたコロニーをプールとしてプレートから掻き取り、そして次の回のシャッフリングのためのPCRテンプレートとして用いた。

【0361】6) 引き続き再組立回

3回のシャッフリングのそれぞれの後に得られた形質転換体を、漸増するレベルのセフォタキシムに播いた。最も高いレベルのセフォタキシムを有するプレート由来のコロニー(>100、多様性を維持するために)をプールし、次の回のPCR反応のためのテンプレートとして用いた。

【0362】上記の工程(5)において0.32~0.64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で得られたセフォタキシム耐性コロニーの混合物を次の回のシャッフリングのためのテンプレートとして用いた。LBブロス中の10 μl の細胞を、上述のように、99℃10分間、次いで[94℃30秒間、52℃30秒間、72℃30秒間]の35サイクル、および次いで72℃5分の再組立プログラムにおいてテンプレートとして用いた。

【0363】再組立産物を消化し、そして上記の工程(5)に記載のようにpUC182Sfiに連結した。混合物をE. coli XL1-blue細胞にエレクトロポアレートし、そして5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のセフォタキシムを有するLBプレートに播いた。

【0364】5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で得られたコロニーを、細胞を80~160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のセフォタキシムを含有するLBプレートに播いた以外は第1および第2の回と同様である第3の回に用いた。第3の回の後、コロニーを、80~160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で得、そして漸増する濃度のセフォタキシムに再プレートした後、コロニーは、37℃で24時間後、320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までで得られた(MIC=320 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。

【0365】セフォタキシムにおける増殖は、細胞密度に依存し、全てのMICが規格化されることを要求する(本発明者らの場合、プレートあたり約1,000細胞まで)。より高い細胞密度で、1280 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの増殖が得られた。1,280 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で増殖された5つの最も大きいコロニーを、単一コロニーのために2回プレートし、そしてSfi I挿入物を、コロニーPCR産物の制限マッピングにより分析した。

【0366】セフォタキシムに対する耐性が16,000倍に増加した(MIC=0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ からMIC=320 $\mu\text{g}/\text{ml}$)1つの変異体が得られた。

【0367】選択後、選択されたクローンのプラスミドを野生型E. coli XL1-blue細胞(St. ratagene, San Diego CA)に戻し、測定された薬剤耐性の全てが、染色体の変異に起因しないことを確認した。

【0368】シャッフリングおよび選択の3つのサイク

ルは、TEM-1 β ラクタマーゼに関する伸展した幅広いスペクトラムの抗生物質であるセフォタキシムの最小阻止濃度における 1.6×10^4 倍の増加を生じた。対照的に、シャッフリングなしの繰り返しのプレーティングは、耐性のわずか16倍の増加のみを生じた(誤りがちなPCRまたはカセット変異誘発)。

【0369】7) 配列分析

1,280 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で生育した5つの最も大きいコロニーの全ては、野生型TEM-1酵素と同一な制限地図を有した。これらのコロニーの内の1つから得られたプラスミドのSfi I挿入物を、製造業者の指示に従い、ジデオキシDNA配列決定法(United States Biochemical Co., Cleveland OH)により配列決定した。全ての塩基番号は、改訂されたpBR322配列(29)に対応し、そしてアミノ酸番号は、ABL標準番号付けスキーム(30)に対応する。アミノ酸は3文字表記で示され、そしてヌクレオチドは1文字表記で示される。用語G4205Aは、ヌクレオチド4205が、グアニジンからアデニンに変化したことを意味する。

【0370】9つの1塩基置換が見い出された。G4205Aは、 β ラクタマーゼP3プロモーター(31)の-35と-10部位との間に位置される。ChenおよびClowes(31)により観察されたプロモーター上方変異体(up-mutant)は、本発明で用いられたSfi Iフラグメントの外側に位置され、従って検出され得なかった。4つの変異は、サイレント変異であり(A3689G、G3713A、G3934A、およびT3959A)、そして4つがアミノ酸変化を生じた(Gly238Serを生じるC3448T、Met182Thrを生じるA3615G、Glu104Lysを生じるC3850T、およびAla18Valを生じるG4107A)。

【0371】8) 分子戻し交配

次いで非必須変異を除去するために、過剰量の野生型DNAを用いた分子戻し交配を用いた。

【0372】分子戻し交配は、DNase I消化およびシャッフリング反応を40倍の過剰量の野生型TEM-1遺伝子フラグメントの存在下で実施した以外は、上述したような通常のシャッフリングと同一な方法によりDNAシャッフリングの第3の回から選択されたプラスミドに対して実施した。戻し交配をより効率的にするために、非常に小さなDNAフラグメント(30~100bp)をシャッフリング反応に用いた。戻し交配変異体を、80~160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のセフォタキシム(Sigma, St. Louis MO)を有するLBプレートで再び選択した。

【0373】この戻し交配シャッフリングを、40倍の過剰量の野生型TEM-1 DNAの存在下での第1の戻し交配回からのコロニー由来のDNAを用いて繰り返

した。戻し交配の効率を増加させるために、小さなDNAフラグメント(30~100bp)を用いた。第2の回の戻し交配変異体を、80~160 μ g/mlのセフトキシムを有するLBプレートで再び選択した。

【0374】得られた形質転換体を160 μ g/mlのセフトキシムに播き、そしてコロニーのプールを、1,280 μ g/mlまでの漸増するレベルのセフトキシムに再プレートした。1,280 μ g/mlで得られた最も大きなコロニーを、単一コロニーのために再プレートした。

【0375】この戻し交配変異体は、野生型よりも32,000倍高い耐性を示した(MIC=640 μ g/ml)。変異体株は、以前に報告された臨床的TEM-1由来株または操作されたTEM-1由来株よりもセフトキシムに対して64倍高い耐性である。従って、DNAシャッフリングは、少なくともいくつかのサイクルの定方向性分子進化のための迅速で強力な手段であるようである。

【0376】戻し交配された変異体のSfiI挿入物のDNA配列を、製造業者の指示に従いジデオキシDNA配列決定キット(United States Biochemical Co., Cleveland O

H)を用いて決定した(表3)。変異体は、9つの1塩基対変異を有した。予測されるように、以前に同定した4つのサイレント変異の全てが消失し、野生型遺伝子の配列に戻っていた。プロモーター変異(G4205A)および4つのアミノ酸変異の内の3つ(Glu104Lys, Met182Thr, およびGly238Ser)は、戻し交配されたクローンに残っていた。このことは、それらが高レベルのセフトキシム耐性のために必須であることを示唆する。しかし、2つの新規のサイレント変異(T3842CおよびA3767G)ならびにアミノ酸変化を生じる3つの新規の変異(Arg241Hisを生じるC3441T, Gly92Serを生じるC3886T, およびAla42Glyを生じるG4035C)が見い出された。これらの2つのサイレント変異は、タンパク質の1次配列に影響しないが、タンパク質の発現レベル(例えばmRNAの構造により)、およびおそらくタンパク質の折り畳みにさえ影響し得る(コドン使用頻度を変化すること、およびそれゆえタンパク質の折り畳みに関係する休止部位を変化することによる)。

【0377】

【表3】

β ラクタマーゼにおける変異

変異型	非戻し交配	戻し交配
アミノ酸変化	Ala16Lys Glu104Lys Met182Thr Gly238Ser -	- Glu104Lys Met182Thr Gly238Ser Ala42Gly Gly92Ser
サイレント	T3959A G3934A G3713A A3689G -	- - - - T3842C A3767G
プロモーター	G4205A	G4205A

【0378】戻し交配変異体および非戻し交配変異体は両方とも1つのプロモーター変異(これは、単独または組み合わせにより発現レベルにおいて2~3倍の増加を生じる)および3つの共通したアミノ酸変化(Glu104Lys, Met182Thr, およびGly238Ser)を有する。Glu104LysおよびGly238Serは、いくつかのセフトキシム耐性TEM-1誘導体または他のTEM-1誘導体(表4)において存在する変異である。

【0379】9) 発現レベル比較

野生型プラスミド、非戻し交配変異体、および戻し交配変異体における β ラクタマーゼ遺伝子の発現レベルを、Witholt, B. (32)の方法に従い浸透圧ショックにより調製された周辺質の抽出物のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(4~20%; Nov

x, San Diego CA)により比較した。

【0380】精製されたTEM-1 β ラクタマーゼ(Sigma, St. Louis MO)を、分子量基準として用い、そしてプラスミドを欠くE. coli XL1-blue細胞をネガティブコントロールとして用いた。

【0381】変異体および戻し交配された変異体は、野生型遺伝子と比較して2~3倍高いレベルの β ラクタマーゼタンパク質を産生するようであった。プロモーター変異は、 β ラクタマーゼの2~3倍の増加を生じるようであった。

【0382】(実施例6. TEM-1 β ラクタマーゼ遺伝子の変異体組み合わせ体の構築)変異の異なる組み合わせの耐性を決定するため、そして発表された変異体と新規の変異体とを比較するために、いくつかの変異体

を、同一のプラスミドバックグroud中に構築した。2つの変異 (Glu104Lys および Gly238Ser) は、セフォタキシム変異体として知られている。構築した全ての変異体の組み合わせは、プロモーター変異を有しており、これは選択された変異体の比較を可能にした。結果を図4に示す。

【0383】変異の特定の組み合わせは、1変異当たり

Ala42Gly

(配列番号 11) AGTTGGGTGGACGAGTGGGTTACATCGAACT **ア** **レ** (配列番号 12)
AACCCACTCGTCCACCCAACTGATCTTCAGCAT;

Gln39Lys:

(配列番号 13) AGTAAAGATGCTGAAGATAAGTTGGGTGCAC GAGTGGGTT **ア** **レ**
(配列番号 14) ACTTATCTTCAGCATCTTTTACTT;

Gly92Ser:

(配列番号 15) AAGAGCAACTCAGTCGCCGCATACACTATTCT **ア** **レ** (配列番号 16)
ATGGCGGCGACTGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAAT;

Glu104Lys:

(配列番号 17) TATTCTCAGAATGACTTGGTTAAGTACTCACCAGT CACAGAA **ア** **レ**
(配列番号 18) TTAACCAAGTCATTCTGAGAAT;

Met182Thr:

(配列番号 19) AACGACGAGCCTGACACCACGAGCGCTGTAGCAATG **ア** **レ** (配列番号 20)
TCGTGGTGTACGCTCGTCGTT;

Gly238Ser alone:

(配列番号 21) TTGCTGATAAAATCTGGAGCCAGTGAGCGTGGGTCTC GCGGT **ア** **レ**
(配列番号 22) TGGCTCCAGATTATCAGCAA;

Gly238Ser and Arg241His (組み合わせ):

(配列番号 23) ATGCTCACITGGCTCCAGATTTATCAGCAAT **ア** **レ**
(配列番号 24) TCTGGAGCCAGTGAGCATGGGTCTCGCGGTATCATT; G4205A:
(配列番号 25) AACCTGTCTCTGGCCACCATGGCCTAAATACAATCAAA
TATGTATCCGCTTATGAGACAATAACCTGTATA

2つのオリゴヌクレオチドを用いて、PCRにより野生型pUC182Sfi中に導入された。

【0384】以下の変異を得るためのオリゴヌクレオチドは以下のようであった。

【0385】

【表4】

【0386】これらの個々のPCRフラグメントを、合成オリゴヌクレオチドからゲル精製した。10ngのそれぞれのフラグメントを組み合わせ、そして再組立反応を、94℃1分間、および次いで25サイクル: [94℃30秒間、50℃30秒間、および72℃45秒間]で実施した。PCRを、SfiI含有外側プライマー (実施例5のプライマーCおよびプライマーD) の存在

下で25サイクルにわたって再組立産物に対して実施した。DNAをSfiIで消化し、そして野生型pUC182Sfiベクターに挿入した。以下の変異体組み合わせが得られた (表4)。

【0387】

【表5】

名称	遺伝子型	MIC	MIC 源
TEM-1	野生型	0.02	
	Glu104Lys	0.08	10
	Gly238Ser	0.16	10
TEM-15	Glu104Lys/Gly238Ser*	10	
TEM-3	Glu104Lys/Gly238Ser/Gln39Lys	10 2-32	37, 15
ST-4	Glu104Lys/Gly238Ser/Met182Thr*	10	
ST-1	Glu104Lys/Gly238Ser/Met182Thr/Ala18Val/T3959A/G3713A/G3934A/A3689G*	320	
ST-2	Glu104Lys/Gly238Ser/Met182Thr/Ala42Gly/Gly92Ser/Arg241His/T3842C/A3767G*	640	
ST-3	Glu104Lys/Gly238Ser/Met182Thr/Ala42Gly/Gly92Ser/Arg241His*	640	

* これらの変異体の全ては、G4205Aプロモーター変異を付加的に含有する。

【0388】保存された変異が、MICにおける15の倍加(doubling)の内の9つの原因であると結論づけられた。

【0389】Glu104Lys単独は、0.08 μ g/mlへのMICの倍加のみを生じることが示され、そしてGly238Ser(いくつかの状況において1つのさらなるアミノ酸変化を有する)は、0.16 μ g/mlのMICのみを生じた(26)。2重変異体Glu104Lys/Gly238Serは、10 μ g/mlのMICを有する。この変異体は、TEM-15に相当する。

【0390】これらの同一のGlu104Lys変異およびGly238Ser変異は、Gln39Lys(TEM-3)またはThr263Met(TEM-4)と組み合わせて、高レベルの耐性(TEM-3について2~32 μ g/mlおよびTEM-4について8~32 μ g/ml(34, 35))を生じる。

【0391】戻し交配後に保存された3つのアミノ酸変化(Glu104Lys/Met182Thr/Gly238Ser)を含有する変異体もまた、10 μ g/mlのMICを有した。これは、新規の選択された変異体のそれぞれが、3つの公知の変異に加えて有する変異が、セフトキシムに対する遺伝子の耐性のさらなる32~64倍の増加の原因であることを意味した。

【0392】天然に存在する、臨床的TEM-1由来酵素(TEM-1~19)のそれぞれは、5~7つのみの同一の変異の異なる組み合わせを含有する(総説)。こ

れらの変異は、遺伝子において十分に分離した位置に存在するので、高度なセフトキシム耐性を有する変異体は、単一の範囲のカセット変異誘発によっては得られ得ない。これは、標準的なカセット変異誘発アプローチにより得られる最大MICが、わずか0.64 μ g/mlである理由を説明し得る(26)。例えば、Glu104Lys変異およびGly238Ser変異は両方とも0.16 μ g/ml未満のMICを有することが本研究において個々に見い出された。DNAシャッフリングの使用は、組み合わせを可能にし、それ故10 μ g/mlのMICを有するGlu104Lys/Gly238Serの組み合わせが見い出された。

【0393】この実施例の重要な制限は、開始点としての単一の遺伝子の使用である。多数の関連した天然に存在する遺伝子がシャッフリングされる場合、より良好な組み合わせが見い出され得ることが意図される。このような混合物に存在する多様性は、変異誘発シャッフリングにより産生されるランダムな変異よりも有意義である。例えば、単一の種由来の関連した遺伝子のレパートリー(例えば、免疫系の既存の多様性)、または多くの異なる種から得られる関連した遺伝子を使用し得ることが意図される。

【0394】(実施例7, 6つの変異体CDR全てのライブラリーのDNAシャッフリングによる抗体A10Bの改善) A10B scFv抗体、マウス抗ウサギIgGは、Pharmacia(Milwaukee WI)から寄贈された。pCANTAB5ファージディス

ブレイベクターを使用する市販のPharmaciaファージディスプレイシステムを使用した。

【0395】本来のA10B抗体は、低いアビディティのみを再現性よく有した。というのは、(ファージELISA (Pharmaciaアッセイキット) またはファージタイターにより測定したところ) 固定化抗原(ウサギIgG)に弱く結合するクローンのみが得られたからである。競合アッセイにおいてA10B抗体結合の50%阻害を生じたウサギIgGの濃度は、13ピコモル濃度であった。観察された低いアビディティはまた、A10Bクローンの不安定さに起因し得る。

【0396】A10B scFv DNAを製造業者の指示に従い配列決定した(United States Biochemical Co., Cleveland OH)。Kabat(33)との比較に基づく、この配列は、既存の抗体と同様であった。

【0397】1) ファージDNAの調製
A10B野生型抗体遺伝子を有するファージDNA(10 μ l)を、99℃にて10分間インキュベートし、次いで72℃にて2分間インキュベートした。PCR混合物(50mM KCl、10mM Tris-HCl pH 9.0、0.1% Triton X-100、200 μ M 各dNTP、1.9mM MgCl)、0.6 μ Mのそれぞれのプライマー、および0.5 μ l Taq DNAポリメラーゼ(Promega, Madison WI)をファージDNAに添加した。PCRプ

ログラムを[94℃30秒間、45℃30秒間、72℃45秒間]の35サイクルにわたって実施した。用いたプライマーは: 5' ATGATTACGCCAAGCTT 3' (配列番号26) および 5' TTGTTCGTCTTCCAGACGTT 3' (配列番号27) であった。

【0398】次いで850bpのPCR産物を電気泳動し、そして2%低融点アガロースゲルから精製した。

【0399】2) フラグメント化
300ngのゲル精製した850bpのバンドを、20分間室温にて、50mM Tris-HCl pH 7.5、10mM MgCl中で0.18単位のDNase I (Sigma, St. Louis MO) で消化した。消化したDNAを、2%低融点アガロースゲルにおいて分離し、そして50~200bp間のバンドをゲルから精製した。

【0400】3) 試験ライブラリーの構築

本実験の目的は、CDRの挿入が効果的であるか否かを試験することである。

【0401】内部に制限酵素部位を有する以下のCDR配列を合成した。「CDR H」は、抗体の重鎖におけるCDRを意味し、「CDR L」は、抗体の軽鎖におけるCDRを意味する。

【0402】制限部位を有するCDRオリゴ:

【0403】

【表6】

CDR H1 (配列番号 34)

5'TTCTGGCTACATCTTCACAGAATTCATCTAGATTTGGGTGAGGCAGACGCTGAA3'

CDR H2 (配列番号 35)

5'ACAGGGACTTGAGTGGATTGGAATCACAGTCAAGCTTATCCTTTATCTCAGGTCTCGAGT
TCCAAGTACTTAAAGGGCCACACTGAGTGTA 3'

CDR H3 (配列番号 36)

5'TGTCTATTTCTGTGCTAGATCTTGACTGCAGTCTTATACGAGGATCCATTGGGGCCAAAGG
GACCAGGTCA 3'

CDR L1 (配列番号 37)

5'AGAGGGTCACCATGACCTGCGGACGTCTTTAAGCGATCGGGCTGATGGCCTGGTACCAAC
AGAAGCTGGAT 3'

CDR L2 (配列番号 38)

5'TCCCCAGACTCCTGATTTATTAAGGGAGATCTAAACAGCTGTTGGTCCCTTTTCGCTTCAGT
3'

CDR L3 (配列番号 39)

5'ATGCTGCCACTTATTACTGCTTCTGCGCGCTTAAAGGATATCTTCATTTCGGAGGGGGGA
CCAAGCT 3'

【0404】上記工程(2)からの50~200bpの精製A10B抗体DNAフラグメントにCDRオリゴを過剰な10倍のモル量で添加した。PCR混合物(50mM KCl、10mM Tris-HCl pH9.0、0.1% Triton X-100、1.9mM MgCl、200 μ Mの各dNTP、0.3 μ l Taq DNAポリメラーゼ(Promega, Madison

WI)、総容積50 μ l)を添加し、そして94℃で1分間、72℃で1分間、次いで35サイクル: 94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で30秒間のシャッフリングプログラムを行った。

【0405】1 μ lのシャッフリング混合液を100 μ lのPCR混合物(50mM KCl、10mM Tris-HCl pH9.0、0.1% Triton

X-100、200 μ mの各dNTP、1.9mM MgCl₂、それぞれ0.6 μ Mの2つの外側プライマー（配列番号26および27、下記参照のこと）、0.5 μ l Taq DNAポリメラーゼ）に添加し、そしてPCRプログラムを30サイクル[94℃で30秒間、

外側プライマー1：配列番号27

5' TTGTCGTCTTTCCAGACGTT 3'

外側プライマー2：配列番号26

5' ATGATTACGCCAAGCTTT 3'

850bpのPCR生成物を制限酵素SfiIおよびNotIで消化し、低融点アガロースゲルから精製し、そしてPharmacia、MilwaukeeWIから得たpCANTAB5発現ベクターに連結した。Invitrogen (San Diego CA)により記載される方法に従って、連結したベクターをTG1細胞(Pharmacia、Milwaukee WI)にエレクトロポレートし、そして単一のコロニーについてプレートした。

【0407】得られるコロニー由来のDNAを100 μ lのPCR混合物(50mM KCl、10mM Tris-HCl pH9.0、0.1% Triton X-100、200 μ mの各dNTP、1.9mM MgCl₂、0.6 μ Mの外側プライマー1（配列番号27、下記参照のこと）および6つの内側プライマー（配列番号40～45；下記参照のこと）、および0.5 μ lのTaq DNAポリメラーゼ）に添加し、そして35サイクル[94℃で30秒間、45℃で30秒間、72℃で45秒間]でPCRプログラムを行った。PCR生成物のサイズを、アガロースゲル電気泳動により測定し、そして制限部位を有するどのCDRが挿入されたのかを決定するために用いた。

45℃で30秒間、72℃で45秒間]行った。得られる850塩基対サイズのDNAフラグメントの混合液をフェノール/クロロホルム抽出し、そしてエタノール沈殿させた。

【0406】外側プライマーは：

gCl₂、0.6 μ Mの外側プライマー1（配列番号27、下記参照のこと）および6つの内側プライマー（配列番号40～45；下記参照のこと）、および0.5 μ lのTaq DNAポリメラーゼ）に添加し、そして35サイクル[94℃で30秒間、45℃で30秒間、72℃で45秒間]でPCRプログラムを行った。PCR生成物のサイズを、アガロースゲル電気泳動により測定し、そして制限部位を有するどのCDRが挿入されたのかを決定するために用いた。

【0408】CDR内側プライマー：

【0409】

【表7】

H 1 (配列番号 40) 5' AGAATTTCATCTAGATTTG 3',
H 2 (配列番号 41) 5' GCTTATCCTTTATCTCAGGTC 3',
H 3 (配列番号 42) 5' ACTGCAGTCTTATACGAGGAT 3',
L 1 (配列番号 43) 5' GACGTCTTTAAGCGATCG 3',
L 2 (配列番号 44) 5' TAAGGGAGATCTAAACAG 3',
L 3 (配列番号 45) 5' TCTGCGCGCTTAAAGGAT 3'

【0410】6つの合成CDRは、野生型A10B抗体DNAの予想された位置に挿入された(図7)。これらの研究は、特定のクローン中の6つのCDRはそれぞれ制限部位を有するCDRになるわずかな機会を有するが、ほとんどのクローンは少なくとも1つの制限部位を有するCDRを保有し、そして制限部位を有するCDRの可能な任意の組み合わせが生成されたことを示した。

【0411】4) 変異相補性決定領域(「CDR」)の構築

本発明者らの配列データに基づき、6つのCDRに対応する6オリゴヌクレオチドを作製した。CDR(Kab

at定義)を70(個の存在塩基):10:10:10の比率で合成的に変異を誘発し、そして約20塩基のフランキング配列により5'末端および3'末端側に隣接させた。このフランキング配列は、変異を誘発しない抗体遺伝子フラグメントの混合物に過剰なモル量で混合する場合、CDRの取り込みに対して相同性を提供する。得られる変異配列を以下に示す。

【0412】CDRライブラリーのオリゴ

【0413】

【表8】

CDR H1 (配列番号 28)

5' TTCTGGCTACATCTTCACAACTTATGATATAGACTGGGTGAGGCAGACGCCTGAA 3'

CDR H2 (配列番号 29)

5' ACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTTCCTGGAGAGGGTGGTACTGAATACAATGA
GAAGTTCAAGGGCAGGGCCACACTGAGTGTA 3'

CDR H3 (配列番号 30)

5' TGTCTATTTCTGTGCTAGAGGGGACTACTATAGGCGCTACTTTGACTTGTGGGGCCAAGG
GACCACGGTCA 3'

CDR L1 (配列番号 31)

5' AGAGGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAGGTATACGTTACATATATTTGGTACCAAC
AGAAGCCTGGAT 3'

CDR L2 (配列番号 32)

5' TCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACGTGGCTCCTGGAGTCCCTTTTCGCTTCAGT
3'

C D R L 3 (配列番号 33)

5' ATGCTGCCACTTATTACTTCCAGGAGTGGAGTGGTTATCCGTACACGTTCCGAGGGGGG
ACCAAGCT 3'.

【0414】太字かつ下線を付した配列は、70:10:10のヌクレオチド(ここで70%は野生型ヌクレオチド)の混合物を用いて合成した変異配列であった。

【0415】過剰な10倍のモル量のCDR変異オリゴを、上記工程(2)からの長さ50~200bpの精製A10B抗体DNAフラグメントに添加した。PCR混合物(50mM KCl、10mM Tris-HCl pH9.0、0.1% Triton X-100、1.9mM MgCl₂、200μmの各dNTP、0.3μlのTaq DNAポリメラーゼ(Promega, Madison WI)、総容積50μl)を添加し、そして94℃で1分間、72℃で1分間、次いで35サイクル:[94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で30秒]のシャッフリングプログラムを行った。

【0416】1μlのシャッフリングした混合物を100μlのPCR混合物(50mM KCl、10mM Tris-HCl pH9.0、0.1% Triton X-100、200μmの各dNTP、1.9mM MgCl₂、それぞれ0.6μMの2つの外側プライマー(配列番号26および27、下記参照のこと)、0.5μlのTaq DNAポリメラーゼ)に添加し、そして30サイクル[94℃で30秒間、45℃で30秒間、72℃で45秒間]でPCRプログラムを行った。得られる850塩基対サイズのDNAフラグメントの混合物をフェノール/クロロホルム抽出し、そしてエタノール沈殿させた。

【0417】外側プライマーは:

外側プライマー1:配列番号27 5' TTGTCTGCTCTTCCAGACGTT 3'

外側プライマー2:配列番号26 5' ATGATTACGCCAAGCTTT 3'.

【0418】5) scFV抗体DNAのpCANTA

B5へのクローニング

850bpのPCR生成物を制限酵素Sfi IおよびNot Iで消化し、低融点アガロースゲルから精製し、そしてPharmacia、Milwaukee WIから得たpCANTAB5発現ベクターに連結した。Invitrogen (San Diego CA)により記載される方法に従って連結したベクターをTG1細胞(Pharmacia Milwaukee WI)にエレクトロポレートし、そして製造業者により推薦されるガイドラインに従ってヘルパーファージを用いてファージライブラリーを増殖させた。

【0419】この様式で生成したライブラリーを、6サイクルの選択を使用して、改善された抗体の存在についてスクリーニングした。

【0420】6) 高親和性クローンの選択

96ウェルのマイクロタイタープレートの15ウェルを、ウサギIgG(Jackson ImmunoResearch, Bar Harbor ME)で10μg/ウェル、37℃で1時間コートし、次いでPBS中の2%のノンファットドライミルクで37℃で1時間ブロックした。

【0421】100μlのファージライブラリー(1×10¹⁰cfu)を100μlの2%のミルクで室温で30分間ブロックし、次いで15ウェルのそれぞれに添加し、37℃で1時間インキュベートした。

【0422】次いで、0.5%のTween-20を含むPBSを用い、37℃で1回の洗浄あたり10分間でウェルを3回洗浄した。結合したファージを100μlの溶出緩衝液(Glycine-HCl, pH2.2)で溶出し、続いて2MのTris pH7.4で迅速に中和し、そしてファージ生産のためにトランスフェクションした。この選択サイクルを6回反復した。

【0423】6サイクルの後、個々のファージクローン

を拾い、そしてファージELISAにより相対的な親和性を比較し、そしてウサギIgGに対する特異性をPharmacia (Milwaukee WI) 製のキットを用いて製造業者により推薦される方法に従ってアッセイした。

【0424】ウエスタンアッセイにより試験した場合、最良のクローンは、野生型A10Bと比較して約100倍の改善された発現レベルを有した。最良のクローンをを用いる競合アッセイにおいて50%の阻害を生じたウサギIgGの濃度は1ピコモル濃度であった。最良のクローンはウサギ抗原に対する特異性に再現性が認められた。ファージによりディスプレイされる抗体のコピー数は増加するようである。

【0425】(実施例8. 部分的遺伝子の直列反復によるインビボでの組換え) プラスミドを2つの部分で構築した。この2つの部分は、これらの2つの直列反復の共通範囲間の組換えが完全長の活性組換え遺伝子をもたらすことを示す同一遺伝子(β-ラクタマーゼ)の不活性コピーである。

【0426】細菌TEM-1βラクタマーゼ遺伝子を保有するpUC18誘導体を使用した(Yanish-Perronら、1985, Gene 33:103-119)。TEM-1βラクタマーゼ遺伝子(「Bla」)は、約0.02μg/mlのセフトキシムに対する耐性を細菌に与える。以下の2つのプライマーを用いるベクター配列のPCRにより、SfiI制限部位を、5'側のプロモーターとβラクタマーゼ遺伝子の3'末端に加えた:

プライマーA (配列番号46) 5' TTCTATTGACGGCCTGTCAGGCCTCATATATACCTTTAGATTGATTT 3'

プライマーB (配列番号47) 5' TTGACGCCTGGCCATGGTGGCCAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTT 3'

および他の2つのプライマーを用いるβラクタマーゼ遺伝子配列のPCRによる場合:

プライマーC (配列番号48) 5' AACTGACCACGGCCTGACAGGCCGGTCTGACAGTTACCAATGCTT 3'

プライマーD (配列番号49) 5' AACCTGTCCTGGCCACCATGGCCTAAATACATTCAAATATGTAT 3'.

【0427】2つの反応生成物をSfiIで消化し、混合し、連結し、そしてこれを用いて以下に記載される手順によりコンピテントなE. coli細菌を形質転換した。得られたプラスミドをpUC182Sfi-Bla-Sfiとした。このプラスミドはBla遺伝子およびP-3プロモーターを保有するSfiIフラグメントを含む。

【0428】pUC182Sfi-Bla-Sfiを保有するE. coli XL1-blue (Stratagen, San Diego CA) に対するセフトキシムの最小阻害濃度は、37°C、24時間後で0.02μg/mlであった。

【0429】pBR322のテトラサイクリン遺伝子を相同性範囲を用いてpUC18Sfi-Bla-Sfiにクローニングし、pBR322TetSfi-Bla-Sfiを得た。次いでSspIおよびFspIを用いるpBR322TetSfi-Bla-Sfiの制限消化および平滑末端連結によりTEM-1遺伝子を欠失させ、pUC322TetSfi-Sfiを得た。

【0430】TEM-1遺伝子の重複領域を標準的なPCR技術および以下のプライマーを用いて増幅した:

プライマー2650 (配列番号50) 5' TTCTTAGACGTCAGGTGGCACTT 3'

プライマー2493 (配列番号51) 5' TTTTAAATCAATCTAAAGTAT 3'

プライマー2651 (配列番号52) 5' TGCTCATCCACGAGTGTGGAGAAGTGGTCCTGCAACTTTAT 3'、および

プライマー2652 (配列番号53) 5' ACCACTTCTCCACACTCGTGGATGAGCAC TTTTAAAGTT 3'.

【0431】2つの得られるDNAフラグメントをSfiIおよびBstXIで消化し、pBR322TetSfi-SfiのSfiI部位に連結した。得られるプラスミドをpBR322Sfi-Bla-LA-Sfiとした。プラスミドの地図ならびに機能的β-ラクタマーゼのプラスミド内組換えおよび再形成のスキームを図9に示す。

【0432】このプラスミドをTG-1細胞またはJC8679 E. coli細胞のいずれかにエレクトロポレートした。E. coli JC8679はRecBCsbcA (Olinerら、1993, NAR 21:5192)である。この細胞をテトラサイクリンを含む固体寒天プレート上にプレートした。次いで、増殖したこれらのコロニーを100μg/mlのアンピリシンを含有する固体寒天プレート上にプレートし、そして生存するコロニーの数をカウントした。アンピリシン耐性を示したこれらの形質転換体中のβ-ラクタマーゼ遺伝子挿入物を、プライマー2650 (配列番号50) 5' TTCTTAGACGTCAGGTGGCACTT 3' とプライマー2493 (配列番号51) 5' TTTTAAATCAATCTAAAGTAT 3' とを用いて標準的なPCR技術により増幅し、そして挿入物の長さを測定した。1kbの挿入物の存在は、図9および表5に示されるように遺伝子がうまく組換えられたことを示す。

【0433】

【表9】

細胞	Tetコロニー	Ampコロニー	コロニーPCR
TG-1	131	21	1 kbで3/3
JC8679	123	31	1 kbで4/4
ベクターコントロール	51	0	

【0434】約17%~25%のテトラサイクリン耐性コロニーはアンピシリン耐性でもあり、そしてすべてのアンピシリン耐性コロニーは、コロニーPCRにより決定されるように、正確に組換えられた。それゆえ、同じプラスミドに位置する部分的遺伝子はいくつも組換えられて機能的遺伝子を作製する。

【0435】(実施例9. 完全長遺伝子の直列反復によるインビボ組換え) β -ラクタマーゼ遺伝子の異なる対立遺伝子の2つの完全長コピーを有するプラスミドを構築した。2つの遺伝子の相同組換えによりこの遺伝子の1つの組換え完全長コピーを得た。

【0436】pBR322TetSfi-SfiおよびpBR322TetSfi-Bla-Sfiの構築については上で述べた。

【0437】 β -ラクタマーゼ遺伝子の2つの対立遺伝子を以下のように構築した。2つのPCR反応をpUC18Sfi-Bla-Sfiをテンプレートとして用いて行った。1つの反応は以下のプライマーを用いて行った。

プライマー2650 (配列番号50) 5' TTCTTAGACGTCAGGTGGCACTT 3'

プライマー2649 (配列番号51) 5' ATGGTAGTCCACGAGTGTGGTAGTGACAGGCCGGTCTGACAGTTACCAATGCTT 3'

第2のPCR反応を以下のプライマーを用いて行った：プライマー2648 (配列番号54) 5' TGTC ACTACCACACTCGTGGACTACCATG

GCCTAAATACATTCAAATATGTAT 3'

プライマー2493 (配列番号51) 5' TTT TAA ATC AATCTA AAG TAT 3'

これにより2つのBla遺伝子(一方のBla遺伝子は5'末端Sfi1部位および3'末端BstX1部位を有し、他方のBla遺伝子は5'末端BstX1部位および3'末端Sfi1部位を有する)を得た。

【0438】これらの2つの遺伝子をBstX1およびSfi1での消化およびSfi1消化プラスミドpBR322TetSfi-Sfiへの連結後、Bla遺伝子の縦列反復を有するプラスミド(pBR322-Sfi-2BLA-Sfi)を得た(図10を参照のこと)。

【0439】このプラスミドをE. coli細胞内にエレクトロポレートした。この細胞を15 μ g/mlのテトラサイクリンを含有する固体寒天プレート上にプレートした。次いで増殖したこれらのコロニーを100 μ g/mlのアンピシリンを含有する固体寒天プレート上にプレートし、そして生存するコロニーの数をカウントした。アンピシリン耐性を示すこれらの形質転換体中のBla挿入物を、実施例8に記載される方法およびプライマーを使用する標準的なPCR技術により増幅した。1kbの挿入物の存在は、表6に示されるように重複遺伝子(duplicate gene)が組換えられたことを示す。

【0440】

【表10】

細胞	Tetコロニー	Ampコロニー	コロニーPCR
TG-1	28	54	1 kbで7/7
JC8679	149	117	1 kbで3/3
ベクターコントロール	51	0	

【0441】コロニーPCRにより、縦列反復が効率的に組換えられて、単一の組換え遺伝子を形成することを確認した。

【0442】(実施例10. 多数サイクルのプラスミド内の直列反復組換え) さらに迅速に耐性細胞を生産するために多数サイクルの組換えを用い得るか否かを決定するために、実施例9に記載される多数サイクルの方法を行った。

【0443】マイナスの組換えコントロールは、 β -ラ

クタマーゼ遺伝子の単一のコピーからなり、一方プラスの組換え実験は、直列反復としての β -ラクタマーゼの2つのコピーを挿入する工程からなった。テトラサイクリンマーカーを用いて、各回においてセフォキシム耐性について選択されたコロニーの数を等しくして連結効率に対して補正をした。

【0444】第1回において、pBR322TetSfi-Bla-SfiをEcrIで消化し、誤りがちなPCRのための正常なPCR混合物とCadwell P

CR混合物 (Cadwell および Joyce (1992) PCR Methods and Applications 2:28-33) との1:1の混合物 (1ml) を用いてPCRにかけた。PCRプログラムは、最初に70℃で2分間、次いで94℃で30秒間、52℃で30秒間、および72℃で3分間ならびに6秒/1サイクルの30サイクルであり、続いて72℃で10分間であった。

【0445】1つのBla遺伝子コントロールプラスミドを作製するためのPCR反応で使用するプライマーは、プライマー2650 (配列番号50) およびプライマー2719 (配列番号55) 5' TTAAGGGA TTTTGGTCATGAGATT 3' であった。これはフラグメント#59としてひとまとめに示され、増幅されたDNAフラグメントの混合された集団を生じた。これらのフラグメントは多くの異なる変異を有した。

【0446】2つのBla遺伝子プラスミドを作製するために2つの異なるPCR反応で使用するプライマーは、第1の遺伝子についてはプライマー2650 (配列番号50) およびプライマー2649 (配列番号51) であり、そして第2の遺伝子についてはプライマー2648 (配列番号54) およびプライマー2719 (配列番号55) であった。これは、2つの増幅したDNAフラグメント: フラグメント#89 (プライマー2648 および2719で増幅した) およびフラグメント#90 (プライマー2650 および2649で増幅した) それぞれの混合された集団を生じた。それぞれの場合、多くの異なる変異体それぞれのフラグメントの混合された集団に導入された。

【0447】誤りがちなPCRの後、増幅されたDNAフラグメント#59の集団をSfi Iで消化し、次いでpBR322TetSfi-Sfi内にクローニングしてプラスミドpBR322Sfi-Bla-Sfiの混合された集団を作製した。

【0448】誤りがちなPCRの後、増幅されたDNAフラグメント#90および#89の集団をSfi IおよびBstXIで50℃で消化し、そしてpBR322TetSfi-Sfiに連結してプラスミドpBR322TetSfi-2Bla-Sfiの混合された集団を作製した (図10)。

【0449】プラスミドpBR322Sfi-Bla-SfiおよびpBR322Sfi-2Bla-SfiをE. coli JC8679内にエレクトロポレートし、そして異なる濃度のセフォタキシムを有する寒天プレートにプレートして耐性株について選択し、そしてテトラサイクリンプレートにプレートして力価を測定し

た。

【0450】等しい数のコロニーを (テトラサイクリン上で増殖するコロニーの数に基づく) 拾い、LB-tet中で増殖させ、そしてコロニーからDNAを抽出した。これは組換えの1回である。このDNAをEcr Iで消化し、そして上記のように第2回の誤りがちなPCRに用いた。

【0451】5回後、1つのフラグメントプラスミドに対するセフォタキシムのMIC (最小阻害濃度) は0.32であったが、2つのフラグメントプラスミドについてのMICは1.28であった。結果は、5サイクル後の組換えにより得られる耐性は、インビボ組換えの存在下では4倍高かったことを示す。

【0452】 (実施例11. フラグメントのエレクトロポレーションを介するインビボ組換え) pUC18Sfi-Bla-Sfiを含む適切なE. coli細胞を記載のように調製した。プラスミドpUC18Sfi-Bla-Sfiは、前出に記載のような標準的なTEM-1 β -ラクタマーゼ遺伝子を含有する。

【0453】pUC18Sfi-cef-Sfi (クローンST2) (Stemmer WPC (1994) Nature 370:389-91、本明細書中で参考として援用される) 由来のTEM-1由来セフォタキシム耐性遺伝子を得た。このプラスミドは、このプラスミドを有するE. coliにセフォタキシムについての640 μ g/mlのMICを与える1つの実験において、完全なプラスミドpUC18Sfi-cef-Sfi DNAを、プラスミドpUC18Sfi-Bla-Sfiを有するE. coli細胞内にエレクトロポレートした。

【0454】別の実験において、pUC18Sfi-cef-Sfi由来のセフォタキシム遺伝子を有するDNAフラグメントを、プライマー2650 (配列番号50) および2719 (配列番号55) を用いるPCRにより増幅した。得られる1kbのPCR生成物をDnaaseにより100bp未満のDNAフラグメントに消化し、そしてこれらのフラグメントをすでにpUC18Sfi-Bla-Sfiを有するコンピテントなE. coli細胞内にエレクトロポレートした。

【0455】次いで、両方の実験からの形質転換された細胞を、セフォタキシムの種々の濃度を有する寒天プレート上に形質転換された細胞をプレートすることによりそのセフォタキシムに対する耐性についてアッセイした。結果を表7に示す。

【0456】

【表11】

コロニー/セフトキシム濃度

	0.16	0.32	1.28	5.0	10.0
DNA コントロールなし	14				
ST-2 変異体, 全体		4000	2000	800	400
ST-2 変異体, フラグメント		1000	120	22	7
野生型, 全体	27				
野生型, フラグメント	18				

【0457】結果から、エレクトロポレーション後、ST-2 Cef 遺伝子全体が細菌ゲノムまたはプラスミドのいずれかに挿入されたように思われる。たいていの挿入物は相同的であるため、この遺伝子がプラスミドに挿入され、野生型遺伝子を置換したことが予想される。ST-2由来のCef 遺伝子のフラグメントはまた、効率的にプラスミド中の野生型遺伝子内に挿入された。野生型遺伝子（全体またはフラグメントでの導入を伴い、そしてDNAの導入を伴わない場合は、セフトキシム耐性の急激な増加は観察されなかった。それゆえ、ST-2フラグメントが野生型フラグメントよりも極めて高いセフトキシム耐性を生じることが示された。耐性を増加させる遺伝子プールから調製されたフラグメントの反復された挿入物が、耐性の増加をもたらすことが意図された。

【0458】従って、ST-2遺伝子フラグメントによりセフトキシム耐性の増加を生じるこれらのコロニーを単離し、そしてプラスミドDNAを抽出した。このD

NAを上記の方法によるPCRを用いて増幅した。増幅したDNAをDNaseで消化してフラグメント(<100bp)にし、そして2~4μgのフラグメントを上記のようにすでにpUC322Sfi-Bla-Sfiを含有するコンピテントなE. coli細胞内にエレクトロポレートした。形質転換された細胞を種々の濃度のセフトキシムを含有する寒天上にプレートした。

【0459】コントロールとして、プラスミドpUC18Sfi-Kan-Sfiを有するコンピテントなE. coliも使用した。pUC18Sfi-cef-SfiのPCR生成物の消化物からのDNAフラグメントを、これらの細胞内にエレクトロポレートした。カナマイシン遺伝子とβ-ラクタマーゼ遺伝子との間には相同性は存在せず、従って組換えは起こらない。

【0460】この実験を2回反復し、そして結果を表8に示す。

【0461】

【表12】

回	Cef 濃度	KAN コントロール	Cef 耐性コロニー
1 再プレート	0.16-0.64 0.32	ロ-ン (lawr) 10 小	ロ-ン 1000
2 再プレート	10	10 100sm @ 2.5	400 50 @ 10
3	40 1280	100 sm	100 sm

【0462】(実施例12. 組換え形式の決定) 本実験は、どの組換え形式が1サイクルあたり最大の組換え体を生成するかを決定するために設計された。

【0463】第1のアプローチにおいて、ベクターpUC18Sfi-Bla-SfiをPCRプライマーで増

幅して、大きなフラグメントおよび小さなフラグメントを生成した。大きなフラグメントはプラスミドおよびBla遺伝子部分を有する末端を有し、そして小さなフラグメントはBla遺伝子の中間部分をコードした。完全なBla遺伝子を有する第3のフラグメントを、実施例

8の方法によりPCRを使用して作製した。より大きなプラスミドフラグメントおよび完全なBla遺伝子を有するフラグメントを上記の方法により同時にE. coli JC8679細胞内にエレクトロポレートし、そして形質転換体を異なる濃度のセフォタキシム上にプレートした。

【0464】第2のアプローチにおいて、ベクターpUC18Sfi-Bla-Sfiを増幅して、上記第1のアプローチにおけるように単離された大きなプラスミドフラグメントを生成した。2つのフラグメントはそれぞれ完全なBla遺伝子の一部を有し、その結果2つのフラグメントが共になって完全なBla遺伝子にまたがる2つのフラグメントもまたPCRにより得た。大きなプラスミドフラグメントおよび2つのBla遺伝子フラグメントをすべてコンピテントなE. coli JC8679細胞内にエレクトロポレートし、そして形質転換体を種々の濃度のセフォタキシム上にプレートした。

【0465】第3のアプローチにおいて、ベクターとプラスミドとの両方をE. coli JC8679細胞内にエレクトロポレートし、そして形質転換体を種々の濃度のセフォタキシム上にプレートした。

【0466】第4のアプローチにおいて、完全なBla遺伝子を、すでにベクターpUCSfi-Sfiを含むE. coli JC8679細胞内にエレクトロポレートし、そして形質転換体を種々の濃度のセフォタキシム上にプレートした。コントロールとしてE. coli JC8679細胞を、完全なBla遺伝子またはベクター単独のいずれかでエレクトロポレートした。

【0467】結果を図11に表す。ベクターへの2つのフラグメントの挿入の効率は、完全なBla遺伝子を有する1つのフラグメントが使用される場合より100倍低い。第3のアプローチは、挿入の効率は遊離DNA末端の存在に依存することを示した。なぜなら、このアプローチでは組換え体が得られなかったからである。しかし、第3のアプローチの結果もまた、ベクターのエレクトロポレーションの低効率によるものであった。発現ベクターがすでにコンピテントな細胞内にある場合、ベクターのエレクトロポレーションの効率はもはや要因ではなく、効率的な相同組換えは非切断のベクターを用いてさえ達成され得る。

【0468】(実施例12、ベクターの性能を最適化するカセットシャッフリングのためのキット)最適化された表現型(例えば、クローニング遺伝子のような、ベクターがコードされる配列の最大の発現)を与え得るベクターを提供するために、シャッフリングされ得る種々のカセットを含むキットが提供され、そして最適化されたシャッフリング体を選択され得る。図12は、それぞれの遺伝子座が複数のカセットを有する1つの実施態様を概略的に示す。例えば、細菌の発現システムにおいて、図13はそれぞれの遺伝子座で使用する例示のカセッ

トを示す。与えられた遺伝子座のそれぞれのカセット(例えば、本実施例のすべてのプロモーター)は、隣接する遺伝子座のカセットのフランキング配列に重複し得、そしてまた、好ましくは相同組換えまたは非相同組換えに関与し得る(例えば、lox/creまたはflp/frt系)実質的に同一な配列と隣接し、遺伝子座内であるが実質的に遺伝子座間ではないカセットのシャッフリングを提供するようにする。

【0469】カセットはPCRフラグメントとしてキットに供給されるが、それぞれのタイプのカセットまたは個々のカセットの種は個別のチューブにパッケージされる。ベクターライブラリーは、それぞれの遺伝子座のカセットの重複フランキング配列と隣接する遺伝子座のカセットとのハイブリダイゼーションによって、プラスミド全体またはその実質的な部分を組立てるチューブの内容物を組み合わせることにより作製される。組立てられたベクターは目的の予め決定した遺伝子へ連結されてベクターライブラリーを形成する。ここで、それぞれのライブラリーのメンバーは目的の予め決定した遺伝子およびカセットの結合により決定されるカセットの組み合わせを含む。ベクターを適切な宿主細胞内に移し、そしてこの細胞を発現に適切な条件下で培養し、そして所望の表現型を選択する。

【0470】(実施例13、緑色蛍光タンパク質(GFP)の特性を最適化するためのシャッフリング)

(背景)緑色蛍光タンパク質(「GFP」)は、238アミノ酸残基および約27,000の分子量を有するアポタンパク質由来のポリペプチドである。GFPは、アミノ酸残基65〜67から形成される発色団を含む。その名前が示すように、GFPは蛍光を発する;それは、ルシフェラーゼのように生体発光しない。インビボでは、GFPの発色団は、発光タンパク質エクオリンと複合体化したコエレンテラジン(coelenterazine)からのエネルギー転移により活性化され、GFPは510nmでの緑色蛍光を示す。青色光またはUV光での照射の際には、GFPは、約510nmで緑色蛍光を示す。

【0471】クラゲAequorea victoriaの緑色蛍光タンパク質(GFP)は、遺伝子発現および調節の非常に有用なレポーターである(Prasherら、(1992) Gene 111: 229; Prasherら、(1995) Trends In Genetics 11: 320; Chalfieら、(1994) Science 263: 802、これらは本明細書中に参考として援用される)。WO 95/21191は、アミノ酸65〜67から形成される発色団を含む、238アミノ酸GFPアポタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を開示している。WO 95/21191は、A. victoria GFPのアポペプチドのcDNAの改変は、変化した

蛍光特性を有するペプチドの合成をもたらすことを開示している。励起振幅における4〜6倍改善をもたらす変異GFP(S65T)が報告されている(Heimら、(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)* 91: 12501)。

【0472】(概要) 緑色蛍光タンパク質(GFP)は、遺伝子調節のレポーターとして急速に幅広く使用されるようになってきている。しかし、多くの生物(特に、真核生物)において全細胞の蛍光シグナルは低すぎることが見出された。目的は、*E. coli*および哺乳動物細胞に対する遺伝子調節のレポーターとして使用するためにGFPの全細胞蛍光を改善することであった。GFPの量子収率は既に0.7〜0.8であり(Wardら、(1982) *Photochem. Photobiol.* 35: 803)、そして標準的な*E. coli*構築物におけるGFPの発現レベルは、既に総タンパク質の75%であったので、合理的な設計によるGFPの改善は、困難であると思われた。

【0473】GFPの改善は、第1に、改善されたコドン使用頻度を有するGFP遺伝子の合成により行われた。次いで、GFP遺伝子は、最も明るいクローンの視覚的な選択と組み合わせた、DNAシャッフリングの反復サイクルまたはGFP遺伝子の有性(sexual)PCRからなる開示された方法により、さらに改善された。*E. coli*における全細胞蛍光シグナルは最適化され、そして次いで、選択された変異体は、真核生物細胞における最良のGFP変異体の性能を決定するためにアッセイされた。

【0474】コドン使用頻度が改善され、そして工業的に標準なGFP構築物(Clontech, Palo Alto, CA)と比較して*E. coli*全細胞蛍光シグナルの2.8倍の改善を有する合成遺伝子が合成された。標準的構築物を超える4.5倍の改善のために、さらなる1.6倍の改善が、有性PCRの3サイクルおよび最も明るい*E. coli*コロニーについての視覚的なスクリーニングから得られた。チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞において発現した、このシャッフリング変異体は、合成構築物を超える4.2倍のシグナルの改善を示した。*E. coli*における発現レベルは、総タンパク質の約75%で変化しなかった。GFPの最大発光および最大励起もまた変化しなかった。*E. coli*において野生型のGFPの大部分は封入体になり、その発色団を活性化することができないが、変異タンパク質の大部分は可溶性でありかつ活性である。従って、3つのアミノ酸変異が、変異タンパク質を、凝集よりむしろ天然のフォールディング経路に導く。この結果は、DNA配列シャッフリング(有性PCR)により、複雑な実施上の問題が解決され得、そして有利な変異改変体を迅速にかつ効率的に作製し得ることを示す。

【0475】(材料と方法)

(GFP遺伝子構築) 公開された配列(Prasherら、(1995)、前出、これは本明細書中に参考として援用される)(238AA、27kD)を有する、GFPタンパク質をコードする遺伝子を、オリゴヌクレオチドから構築した。市販のGFP構築物(Clontech, Palo Alto, CA)とは対照的に、この配列は、元のcDNAクローンに見出されるように、fMetの後にAla残基を含んでいた。54〜85塩基の範囲の14オリゴヌクレオチドを、PCR伸長により7対として組み立てた。これらのセグメントを、制限酵素により消化し、そしてベクターAlpha+GFP(Whitehornら、(1995) *Bio/Technology* 13: 1215、これは本明細書中に参考として援用される)に別々にクローニングし、そして配列決定した。次いで、これらのセグメントを、真核生物発現ベクターAlpha+に連結して、完全長GFP構築物、Alpha+GFPを形成した(図14)。得られたGFP遺伝子は、アミノ酸73位(CG T)、80位(CG G)、96位(CG C)、および122位(CG T)で変化したアルギニンコドンを含んでいた。コドンの偏りを減少させ、そして*E. coli*における発現を容易にするために、多くの他のサイレント変異を配列に操作して、遺伝子の組立に使用される制限部位を作製した。これらは、S2(AGTからAGC; Nhe I部位を作製するため)、K41(AAAからAAG; Hind III)、Y74(TACからTAT)、およびP75(CCAからCCG; Bsp E1)、T108(AGAからAGG; Nnu I)、L141(CTCからTTG)、およびE142(GAAからGAG; Xho I)、S175(TCCからAGC; Bam HI)、ならびにS202(TCGからTCC; Sal I)であった。この遺伝子の5' および3' 非翻訳末端は、それぞれ、Xba I部位およびEco R I部位を含んでいた。遺伝子の配列を、配列決定により確認した。

【0476】他の適切なGFPベクターおよび配列は、GenBankデータベースから、例えば、インターネットワールドワイドウェブを介して、ファイル: CVU36202、CVU36201、XXP35SGFP、XXU19282、XXU19279、XXU19277、XXU19276、AVGFP2、AVGFP1、XXU19281、XXU19280、XXU19278、AEVGFP、およびXXU17997(これらは、配列ファイルおよびコメントが本明細書中に印刷および挿入されるのと同程度に、本明細書中に参考として援用される)として得られ得る。

【0477】Alpha+GFPのXba I-Eco R Iフラグメント(全GFP遺伝子を含む)を、原核生物発現ベクターpBAD18(Guzmanら、(1995) *J. Bacteriol.* 177: 4121)

にサブクローニングし、細菌発現ベクターpBAD18-GFP (図14)を得た。このベクターにおいて、GFP遺伝子発現は、アラビノースプロモーター/リプレッサー (araBAD) の制御下にあり、これはアラビノース (0.2%) で誘導可能である。これは、元のアミノ酸配列を有する唯一の構築物であるので、野生型GFP (「WT」) と呼ばれる。GFP発現細菌ベクターを、Clontech (Palo Alto, CA) から入手したが、これは本明細書中で「Clontech」構築物という。「Clontech」構築物からのGFP発現は、IPTG誘導を必要とする。

【0478】(遺伝子シャッフルングおよび選択) 全GFP遺伝子を含む約1kbのDNAフラグメントを、プライマー5' TAGCGGATCCTACCTGACGC (NheI付近) および5' GAAAATCTTCTCTCATCCG (EcoRI付近) を用いるPCRによりPBAD-GFPベクターから得、そしてWizard PCR prep (Promega, Madison, WI) により精製した。このPCR産物を、DNase I (Sigma) を用いてランダムフラグメントに消化し、そして50~300bpのフラグメントを、2%低融点アガロースゲルから精製した。精製したフラグメントを、Taq DNAポリメラーゼ (Promega) と共にPCR混合物 (Promega, Madison, WI; 0.2mM 各dNTP/2.2mM MgCl₂/50mM KCl/10mM Tris-HCl, pH9.0/0.1% Triton-X-100) に10~30ng/ μ lで再懸濁し、そしてStemmer, WPC (1994) Nature 370: 389 (本明細書中に参考として援用される) に記載されたように、94℃30秒、45℃30秒、72℃30秒の35サイクルのPCRプログラムを用いて (プライマーを用いずに) 組み立てた。この反応産物を、新しいPCR混合物に40倍に希釈し、そして完全長産物を、94℃30秒、50℃30秒、72℃30秒、続いて72℃10分間の25サイクルのPCRで同じ2つのプライマーを用いて増幅した。NheIおよびEcoRIを用いた再組立産物の消化の後、点変異させ、そしてインビトロで組換えたGFP遺伝子のこのライブラリーを、PBADベクターにクローニングし戻し、E. coli TG1 (Pharmacia) にエレクトロポレーションし、そして100 μ g/mlアンピシリンおよび0.2%アラビノースを含むLBプレートにプレーティングして、アラビノースプロモーターからのGFP発現を誘導した。

【0479】(変異体選択) 標準UV光ボックス (365nm) の上で、40の最も明るいコロニーを選択し、そしてプールの。コロニーのプールをPCR反応のテンプレートとして使用し、GFP遺伝子のプールを得た。サイクル2および3を、サイクル1と同一に行っ

た。サイクル3の最良の変異体を、マイクロタイタープレート中でコロニーを増殖させ、そしてマイクロタイタープレートで、蛍光分光測定することにより同定した。

【0480】E. coliにおける変異体の特徴付けのために、DNA配列決定を、Applied Biosystems 391 DNAシーケンサーで行った。

【0481】(GFPのCHO細胞発現) GFP遺伝子の野生型ならびにサイクル2および3変異体バージョンを、EcoRI-XbaIフラグメントとして、真核生物発現ベクターAlpha+ (16) に移入した。プラスミドを、400Vおよび250 μ Fで、40 μ gのプラスミドを含む0.8ml中で10⁷細胞のエレクトロポレーションによりCHO細胞にトランスフェクトした。形質転換体を、10~12日間、1mg/ml G418を用いて選択した。

【0482】FACS分析を、488nmに調製したアルゴンイオンレーザーを用いてBecton Dickinson FACSTAR Plusで行った。蛍光を、535/30ランの帯域通過フィルターを用いて観察した。

【0483】(結果)

(コドン使用頻度) コドン使用頻度が改変された合成GFP構築物 (「WT」) を発現するE. coliは、「Clontech」構築物を発現する細胞よりほぼ3倍大きな全細胞蛍光シグナルを生じた (図15A)。この比較を、完全な誘導および等しいOD₆₀₀で行った。

「WT」構築物中の乏しいアルギニンコドンの置換および「Clontech」構築物に存在するN末端伸長に加えて、発現ベクターおよびGFPプロモーターは全く異なる。蛍光シグナルの改善の原因は、発現レベルの増強ではなく、タンパク質性能の改善である。

【0484】(有性 (sexual) PCR) 合成「WT」GFP構築物の蛍光シグナルを、本明細書中およびStemmer WPC (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 91: 10747およびStemmer WPC (1994) Nature 370: 389 (これらは、本明細書中に参考として援用される) に記載される有性PCR法により、変異体ライブラリーを構築し、続いてプレーティングし、そして最も明るいコロニーを選択することにより、さらに改善した。有性PCRおよび選択の2回目のサイクルの後、「WT」より約8倍、そして「Clontech」構築物より23倍改善された、変異体 (「サイクル2」) を得た。3回目のサイクルの後、「WT」構築物より約16~18倍、そして「Clontech」より45倍大きく改善された、変異体 (「サイクル3」) を得た (図15B)。変異体の励起および放出スペクトルのピーク波長は、「WT」構築物のそれと同一であった。全細胞のSDS-PAGE分析により、3つ全ての構築物で発現したGFPタンバ

ク質の総レベルは、総タンパク質の約75%という驚くべき高い割合で変化しないことが示された(図16、パネル(a)および(b))。超音波処理および遠心分離による細胞の分画化により、「WT」構築物は封入体の形態でほとんど不活性なGFPを含むが、「サイクル3」変異体GFPはほとんど可溶性のままであり、そしてその発色団を活性化し得ることが示された。変異遺伝子を配列決定し、そして「サイクル1」変異体は、「サイクル3」変異体よりも多く変異を含むことが見出された(図17)。「サイクル3」は、「WT」構築物と比較して3つのタンパク質変異および3つのサイレント変異を含んでいた。変異F100S、M154T、およびV164Aは、疎水性残基のより親水性残基での置換を含む(KyteおよびDoolittle, 1982)。1つのもっともらしい説明は、天然のGFPは、その表面上に疎水性部位を有し、これによりエクオリンまたは別のタンパク質に正常に結合することである。この他のタンパク質がなければ、疎水性部位は凝集を引き起こし得、そして発色団の自己触媒活性化を妨げ得る。3つの親水性変異体は、疎水性部位を相殺し得、これは凝集の低減および発色団活性化の増大をもたらす。37℃での全細胞を用いたパルスチェイス実験により、発蛍光形成の $T_{1/2}$ は、「WT」GFPおよび「サイクル3」変異体GFPの両方について95分であることが示された。

【0485】(CHO細胞)自己フォールディングのような自立的特性における改善は、異なる細胞環境に移入可能であり得る(transferable)。細菌において選択した後、「サイクル3」変異GFPを、真核生物Alpha+ベクターに移入し、そしてチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)において発現させた。E. coliにおいて「サイクル3」構築物は、「WT」構築物より16~18倍強いシグナルを与えたが、「サイクル3」変異体を発現するCHO細胞の蛍光分光測定は、同一の条件下で「WT」構築物より42倍大きな全細胞蛍光シグナルを示した(図18A)。FACS分別により、「サイクル3」を発現するCHO細胞クローンの平均蛍光シグナルは、「WT」構築物を発現するCHO細胞より46倍大きいことが確認された(図18B)。「WT」構築物に関する限りでは、2mMの酪酸ナトリウムの添加により、蛍光シグナルが約4~8倍増加することが見出された。

【0486】(スクリーニング対選択)これらの結果を、約10,000コロニーの視覚的スクリーニングにより得、そして最も明るい40のコロニーを各サイクルで採集した。タンパク質機能における著しい改善を、比較的少ない数の改変体により得ることができた。この驚くべき発見を考慮すると、有性PCRは、多数の商業的に重要な酵素の最適化(これについては、大規模な変異体選択は実行可能でも効率的でもない)のために改善さ

れたプロセスとして、高スループットスクリーニング手順と組合せ得る。

【0487】(実施例14. 改善したペプチドディスプレイライブラリーを作製するためのシャッフリング)(背景)一旦組換え体がファージディスプレイライブラリー、ポリソームディスプレイライブラリーなどから特徴づけられると、元々ディスプレイされた(displayed)配列の改変体をディスプレイする第2世代ライブラリーを構築およびスクリーニングすることはしばしば有用である。しかし、7残基より長いポリペプチドの組合せの数は非常に多いので、全ての順列は、一般的に一次ライブラリーには存在しない。さらに、配列を変異することにより、単離された配列周辺の「配列景観(landscape)」は、局所的最適(local optima)を見出すために調べられ得る。

【0488】変異誘発の目的のために実験者に利用可能ないくつかの方法がある。例えば、適切な方法として、位置指定変異誘発、カセット変異誘発、および誤りがちなPCRが挙げられる。

【0489】(概要)インビトロで変異を作製するための開示された方法は、DNAシャッフリングとして知られている。DNAシャッフリングの実施態様において、遺伝子は、DNase Iで小さなランダムフラグメントに破壊され、次いでPCR様反応において、典型的にはいずれのプライマーも使用することなく再組立される。再組立するプロセスは、プルーフリーディングポリメラーゼの非存在下では変異原性であり得、エラー率が約0.7%まで生じる。これらの変異はトランジションおよびトランスバージョンの両方からなり、これらは、しばしば再組立されたセグメント長にわたってランダムに分布する。

【0490】一旦、所望の特性を有するファージディスプレイ組換え体を単離すると、これは、一般的に、DNAシャッフリングを介する一回の分子進化により結合特性を改善または改変するのに適する。ディスプレイされたペプチドおよび抗体の第2世代ライブラリーを作製し、そして明らかに結合強度が改善された(すなわち、3~1000倍)単離ファージを生成した。従って、反復回のライブラリー作製および選択により、配列空間を通して最適結合まで「ヒルクライム(hill-climb)」することが可能である。

【0491】第2世代ライブラリーから、非常にしばしば、より強い結合種が単離され得る。このようなファージの選択的な濃縮は、広範囲の洗浄と組合わせてまたは当該分野で公知の他の手段により、マイクロタイタープレート上に固定されたまたは溶液中のより低い標的濃度でスクリーニングすることにより達成され得る。別の選択は、ファージ上で低い結合価(valency)の分子の変異原化(mutagenized)集団をディスプレイして、より高い親和性定数を有する分子を選択す

ることである。最終的に、親ファージの効率的な結合をブロックする低濃度の結合インヒビター（すなわち、標的、リガンド）の存在下で、第2世代ライブラリーをスクリーニングすることは可能である。

【0492】（方法）

（例示的な変異誘発プロトコル）組換えDNAを基礎とした変異誘発の形態は、オリゴヌクレオチド媒介部位指定変異誘発として知られている。オリゴヌクレオチドは、標的DNAと塩基対を形成するが、一方このオリゴヌクレオチドの中心部近くで1つ以上の塩基が異なるように設計される。このオリゴヌクレオチドが一本鎖テンプレートDNAと塩基対形成した場合、ヘテロ二重鎖は、インビトロで二本鎖DNAに変換される；このように、一本鎖の産物は、変異原性オリゴヌクレオチドにより、ヌクレオチド配列を特異的にする。次いで、これらのDNA分子は、インビトロで増殖され、そして所望の組換え体は、最終的に、形質転換体の集団間で同定される。

【0493】一本鎖変異誘発のためのプロトコルを、以下に記載する。

【0494】1. M13ファージまたはファージミドから一本鎖DNAを調製する。約2μgのDNAを単離する。DNAは、dut⁻ung⁻細菌宿主（供給源）から単離し得、その結果、回収されたDNAは、多くのチミン残基の代わりにウラシルを含む。

【0495】2. 変異される部位に隣接するコーディング領域に対して、少なくとも15または20残基の相補性を有するオリゴヌクレオチドを設計する。このオリゴヌクレオチドにおいて、ランダム化される領域は、縮重コドンにより表され得る。非相補領域が大きい場合（すなわち、>12ヌクレオチド）、隣接領域は、正確な塩基対形成を確実にするために伸長されるべきである。オリゴヌクレオチドは、変異誘発の手順の効率が改善されるので、5' PO₄基（この基はまた、T4ポリヌクレオチドキナーゼにより酵素的に付加され得る）を有して合成されるはずである。（Eppendorfチューブにおいて、50mM (pH7.5)、10mM MgCl₂、5mM DTT、および0.4mM ATP中で、100ngのオリゴヌクレオチドを2単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼと共に30分間インキュベートする。）

3. 1μgの一本鎖DNA、10ngのオリゴヌクレオチド、20mM Tris-HCl (pH7.4)、2mM MgCl₂、50mM NaClを含む、500μlのEppendorfチューブ中でオリゴヌクレオチドと一本鎖DNAとをアニーリングする。

【0496】4. この溶液を共に混合し、そして2、3秒間チューブを遠心分離して液体を再回収する。70℃に熱した水を含むチューブをフラスコ中で加熱する。5分後、フラスコをラボベンチ (lab bench) に

移し、そして室温までゆっくりと冷却させる。

【0497】5. チューブを水溶から取り出し、そしてそれを氷上に置く。以下の試薬（総容量100μl：20mM Tris-HCl (pH7.4)、2mM DTT、0.5mM dATP、dCTP、dGTP、およびdTTP、0.4mMATP、1単位のT7 DNAポリメラーゼ、2単位のT4 DNAリガーゼ）をチューブに添加する。

【0498】6. 1時間後、EDTAを10mMの最終濃度まで添加する。

【0499】7. 20μlをサンプルから採集し、そしてアガロースゲル上で流す。一本鎖DNAの大部分は、共有結合により閉鎖したDNAに変換されるはずである。隣接したレーンでいくつかのコントロールを電気泳動させる（すなわち、テンプレート、オリゴヌクレオチドを含まないテンプレート反応物）。二本鎖環状DNAを閉じるために、T4 DNAリガーゼを添加する。

【0500】8. フェノール抽出によりDNA (80μl)の残渣を抽出し、そしてエタノール沈澱により回収する。

【0501】9. ung⁺細菌にエレクトロポレーションする。

10. PEG沈澱により第2世代ファージを採集する。

【0502】（カセット変異誘発）コーディング領域内の特定の部位で変異を導入する簡便な手段は、カセット変異誘発によるものである。「カセット」は、いくつかの異なる方法により作製され得る：A) 2つのオリゴヌクレオチドを共にアニーリングし、そしてそれらを二本鎖DNAに変換することによる；B) 最初に、ランダム化された配列を有するオリゴヌクレオチドを用いてDNAのセグメントを増幅し、次いでこのDNAを再増幅してクローニングのためのカセットを作製することによる；C) 最初に、DNAセグメントの各半分を、ランダム化された配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて増幅し、次いで2つの断片を共に加熱して、クローニングのためのカセットを作製することによる；およびD) 誤りがちなPCRによる。これらの4つの手順により形成されたカセットは、長さおよびコーディングフレームが固定されているが、低頻度で不特定なコドンを含む。従って、カセットのクローニングおよび発現は、カセットの全長に沿って1つ以上の変異残基を有する、複数のペプチドまたはタンパク質を生成する。

【0503】典型的に、2つの型の変異誘発スキームが使用され得る。第1に、ファージディスプレイタンパク質またはペプチドにおける特定の残基は、完全にランダム化され得る。これらの位置でのコドンは、NNN、NNK、またはNNSであり得、これらは32コドンを使用して20残基全てをコードする。これらはまた、予め形成されたトリプレットとして、またはスプリットレジン (split-resin) 法により合成されるオリ

ゴヌクレオチドを混合することにより合成され得、これらはそれぞれの所望の位置で20コドン全てを覆う。逆に、コドンのサブセットを使用して、特定のアミノ酸に有利にし、そして他を排除し得る。第2に、カセットにおける全てのコドンは、変異されるという可能性はいくらか低い。これは、別々の3つの塩基で「スパイクされた(spiked)」ボトルを用いて合成されたオリゴヌクレオチドにより、またはスプリットレジジン法により共に混合されるオリゴヌクレオチドの比率を変えることにより、達成される。

【0504】短い領域の変異誘発については、合成オリゴヌクレオチドでのカセット変異誘発が一般的に好ましい。1より多いカセットは、いくつかの領域を同時に改変する時に使用され得る。このアプローチは、変異抗体のライブラリーを作製する場合に好ましく、ここで、6つ全ての相補性決定領域(CDR)が同時に改変される。

【0505】(ランダムコドン)

1. 固定位置および変異位置を有するオリゴヌクレオチドを設計する。固定位置は、結合または機能に必須であると推測されるクローニング部位およびそれらのコーディング領域に対応しなければならない。

【0506】2. オリゴヌクレオチドの合成の間、オリゴヌクレオチド合成機に、等モル量の各塩基(N)、グアノシンおよびシトシン(K)、グアノシンおよびチミジン(S)を送達させる。

【0507】(「スパイク(spiked)」コドン)

1. 固定位置および変異位置を有するオリゴヌクレオチドを設計する。固定位置は、結合または機能に必須であると推測されるクローニング部位およびそれらのコーディング領域に対応しなければならない。各位置で別々の3つのヌクレオチドの画分(x)で合成された長さ(m)のポリヌクレオチドカセットにおいて、誤り(n)を見出す確率を以下のように表す:

$$P = [m! / (m-n)!] \cdot [x^n] \cdot [1-x]^{m-n}.$$

【0508】2. オリゴヌクレオチドの合成の間、塩基ボトルを消す。固定位置に対して100%の各塩基を有するボトル、ならびに100-X%の1つの塩基およびX/3%の各別々の3つの塩基を有するボトルを用いる。ドーピング(doping)率はまた、天然の球状タンパク質における平均アミノ酸使用または他のアルゴリズムに基づいて異なり得る。市販のコンピュータプログラムであるCyberDopeが存在し、これは、特定のドーピングスキームを用いてオリゴヌクレオチドを合成するための塩基混合物の決定を補助するために、使用され得る。CyberDopeプログラムのデモンストレーションコピーは、cyberdope@aol.com.へEメール請求を送ることにより得られ得る。

【0509】(位置指定コドン)

1. 固定位置および変異位置を有するオリゴヌクレオチドを設計する。固定位置は、結合または機能に必須であると推測されるクローニング部位結合およびそれらのコーディング領域に対応しなければならない。20アミノ酸全てをコードする特定の制限酵素部位でオリゴヌクレオチドのセットを挿入するための1つの方法が記載されている(Kegler-Eboら、(1994) Nucleic Acids Res. 22: 1593 (これは本明細書中に参考として援用される))。

【0510】2. オリゴヌクレオチドの合成の間に、各コドンで樹脂を分離させる。

【0511】(誤りがちなPCR)増幅の間に変異のレベルを上昇させるための、標準的なPCR条件(Saikiら、(1988) Science 239: 487 (これは、本明細書中に参考として援用される))に基づいたいくつかのプロトコルが存在する。上昇したdNTP濃度およびMn²⁺の添加は、変異速度を著しく増加させる。変異は理論的にはランダムに導入されるので、これは、新規のタンパク質の集団を生成するための1つの機構である。一方、誤りがちなPCRは、コード領域が短いので、短いペプチド配列を改変するのにはあまり適切ではなく、そして変化の速度が遅すぎて、選択に適切な数の変異体を生成できない。また、これは、コーディング領域内で多くの変異が存在して解析を複雑にするので、長いタンパク質についても理想的でない。

【0512】1. フェージ内で目的のコーディング領域に隣接するオリゴヌクレオチドプライマーを設計する。それらは、しばしば、約21ヌクレオチド長であり、そして変異誘発される領域に隣接する。増幅されるフラグメントは、適切なベクターでのサブクローニングを容易に可能にするための、その中に制限部位を有し得る。

【0513】2. 以下の反応を設定する:

1 pmoleの各プライマー; 1 pmoleのDNAテンプレート; 100mM NaCl、1mM MnCl₂、1mM DTT、0.2mMの各dNTP、2単位のTaq DNAポリメラーゼ。

【0514】3. 液体をミネラルオイルで覆う。

【0515】4. 1kbまでのフラグメントを増幅するために、94℃30秒、45℃30秒、および72℃30秒の間に24回サイクルを行う。より長いフラグメントについては、72℃の工程を、各kbについて約30秒延長する。

【0516】5. 完全長の分子の画分を増大するために、72℃で5~10分間PCR反応を延長する。これは、フラグメント末端が後にサブクローニングに使用される制限部位を含む場合に、重要である。

【0517】6. PCR反応を、必要に応じて、ゲル電気泳動によりモニターする。

【0518】7. PCR産物を、適切な制限酵素を用いて消化して付着末端を作製する。制限フラグメントを、

ゲル精製し得る。

【0519】8. DNAセグメントを、連結により適切なベクターにクローニングし、そして宿主細胞に導入する。

【0520】(DNAシャッフリング) DNAシャッフリングにおいて、遺伝子は、ホスホジエステル結合溶解剤(例えば、DNase I)を用いて小さなランダムフラグメントに破壊され、次いで、PCR様反応(しかし、いずれのプライマー添加も必要としない)において再組立される。再組立するプロセスは、ブルーフリーディングポリメラーゼの非存在下では変異原性であり得、これは10~50bpのフラグメントが使用される場合、約0.7%までの誤りを生じる。

【0521】1. PCRは、シャッフルされるフラグメントを増幅する。しばしば、細菌コロニーまたはプラークからのPCRに簡便である。滅菌爪楊枝でコロニーまたはプラークに触れ、そしてPCR反応混合物(緩衝液、デオキシヌクレオチド、オリゴヌクレオチドプライマー)中でかき回す。爪楊枝を取り出し、そして99℃で10分間反応物を加熱(beat)する。反応物を72℃まで冷却し、1~2単位のTaq DNAポリメラーゼを添加し、そして94℃30秒、45℃30秒、72℃30秒を35回、反応をサイクルし、そして最終的にサンプルを72℃で5分間加熱する。(所定の条件は、1kbの遺伝子についてであり、そして記載の配列の長さに従って改変される。)

2. 遊離プライマーを取り除く。プライマーを完全に除去することが重要である。

【0522】3. 約2~4μgのDNAを、100μlの50mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM MgCl₂中で、0.15単位のDNase I (Sigma, St. Louis, MO)を用いて、室温で5~10分間フラグメント化する。ドライアイスで凍結させ、2%低融点アガロースゲルまたは等価物上でフラグメントの大きさの範囲を調べ、そして溶解して所望の大きさの範囲が使用されるまで消化を続ける。所望の大きさの範囲はこの適用に依存する; 1kbの遺伝子のシャッフリングについては、100~300塩基のフラグメントが、通常適切である。

【0523】4. 所望のDNAフラグメントの大きさの範囲は、2%低融点アガロースゲルまたは等価物からゲル精製される。好ましい方法は、DNAの直前にWhatman DE-81イオン交換紙の小さな断片を挿入し、DNAをこの紙に走らせ、紙を0.5mlの1.2M NaClを含むTEに入れ、30秒間ボルテックスし、次いで全ての紙を注意深くスピナウトし、上清を移し、そして2容量の100%エタノールを添加して、DNAを沈澱させることである; サンプルの冷却は必要ではない。次いで、DNAベレットを70%エタノールで洗浄して、微量の塩を取り除く。

【0524】5. DNAベレットを、0.2mMの各dNTP、2.2mM MgCl₂、50mM KCl、10mM Tris-HCl (pH9.0)、0.1% Triton X100を含むPCR mix (Promega, Madison, WI)中で、1μlのPCR mixあたり約10~30ngのフラグメントの濃度(代表的には、10~20μlのPCR反応物あたり100~600ng)で再懸濁する。プライマーには、このPCR反応において何も添加する必要はない。Taq DNAポリメラーゼ (Promega, Madison, WI)のみが、実質的な変異誘発速度(10~50bpのDNAフラグメントで0.7%まで)が所望される場合に使用され得る。ブルーフリーディングポリメラーゼを含む(例えば、TaqおよびPfu DNAポリメラーゼ (Stratagene, San Diego, CA)の1:30 (vol/vol)混合物)すれば、エラー率がより低くなり、そして非常に長い配列のPCRが可能になると期待される。94℃30秒、45~50℃30秒、72℃30秒の30~45サイクルの後、4℃で保持されるプログラムを、MJ Research PTC-150ミニサイクラー (Cambridge, MA)において使用する。この組立の進行は、ゲル解析により調べ得る。この時点でのPCR産物は、より大きなおよびより小さな大きさのスマア (smear) において正しい大きさの産物を含む。

【0525】6. 正しく再組立されたこの第1のPCR産物を、無関係な (outside) プライマーを含む第2のPCR反応において増幅する。7.5μlのPCR再組立のアリコート、0.8pMの各プライマーを含むPCR mixを用いて40倍に希釈する。94℃30秒、50℃30秒、72℃30~45秒の20サイクルのPCRプログラムを作動し、終了時には72℃で5分で作動する。

【0526】7. 次いで、所望のPCR産物を、末端制限酵素で消化し、ゲル精製し、そしてベクターにクローニングし戻す。このベクターは、しばしば、宿主細胞に導入される。

【0527】部位特異的組換えもまた、例えば、抗体分子の結合親和性および結合特異性を増大させる手段として、感染細菌細胞内で重抗体鎖および軽抗体鎖をシャッフリングするために使用され得る。Cre/lox系 (Waterhouseら、(1993) Nucl. Acids Res. 21: 2265; Griffithsら、(1994) EMBO J. 13: 3245 (これらは、参考として援用される)) およびint系を使用することが可能である。

【0528】異なるDNA分子上で生じる有利な変異を組み合わせるために、組換え体を採取し、そしてそれらを共にシャッフリングすることは可能であり、そしてイ

ンサートをディスプレイされた組換え体を採取し、そしてDNAシャッフリングにより親配列と「戻し交配 (backcross)」して、所望の形質に寄与しないあらゆる変異を取り除くこともまた可能である。

【0529】(実施例15. 改善したヒ酸塩解毒細菌を作製するためのシャッフリング) ヒ素解毒は、金鉱を含む硫砒鉄鉱の金採掘および他の使用 (例えば、環境改善) に重要である。ヒ酸塩解毒オペロンをコードするオペロンを含むプラスミド pGJ103 (Wangら、(1989) *Bacteriol.* 171: 83 (これは、本明細書中に参考として援用される)) を、Prof. Simon Silver (U. of Illinois, Chicago, IL) から入手した。pGJ103 (pUC19にクローニングされた p1258ars オペロンを含む) を含む *E. coli* TG1 は、LB amp プレート上で $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の MIC (最小阻害濃度) を有していた。全 5.5 kb のプラスミドを、DNase I を用いて 100~1000 bp のフラグメントにフラグメント化し、そして Perkin Elmer XL-PCR 試薬を用いて PCR により再組立した。組立後、プラスミドを、独特の制限酵素 BamHI を用いて消化した。完全長モノマーを、アガロースゲルから精製し、連結し、そして *E. coli* TG1 細胞にエレクトロポレーションした。形質転換細胞を、一定の範囲のヒ酸ナトリウム濃度 (1 回目では 2、4、8、16 mM) 上にプレーティングし、そして最高のヒ酸塩レベルを有するプレートから約 1000 コロニーを、プレートをかきとることによりプールした。細胞を、同濃度のヒ酸塩の存在下で液体中で増殖させ、そしてプラスミドをこの培養物から調製した。2 回目および 3 回目は、細胞をより高いヒ酸塩濃度でプレーティングした以外は 1 回目と同一であった。8、16、32、64 mM を 2 回目に使用した；そして 32、64、128、256 mM を 3 回目の選択に使用した。

【0530】最良の変異体は、128 mM までのヒ酸塩 (MIC=256) で一晩増殖した (64 倍の改善)。改善された株のうちの 1 つは、TG1 (野生型 pGJ103) が 10 mM まで液体中で増殖するが、シャッフリングされた TG1 (変異体 pGJ103) は、150 mM までのヒ酸塩濃度で増殖することを示した。

【0531】この組立の PCR プログラムは、プライマーを用いずに、サーキュラー PCR 形式を用いて 94°C 20 秒、 $50 \times (94^{\circ}\text{C} 15 \text{ 秒}, 50^{\circ}\text{C} 1 \text{ 分}, 72^{\circ}\text{C} 30 \text{ 秒} + 2 \text{ 秒/サイクル})$ であった。

【0532】4 サイクルのプロセスで、シャッフリングされたヒ酸塩耐性オペロンにより付与されるヒ酸塩に対する耐性が 50~100 倍改善された；改善したオペロンを含む細菌は、500 mM までのヒ酸塩を含む培地で増殖した。

【0533】図 19 は、ヒ酸塩解毒経路オペロンを含む

pGJ103 プラスミドのシャッフリングの結果としてのヒ酸塩毒性に対する耐性の増強を示す。

【0534】(実施例 16. 改善したカドミウム解毒細菌を作製するためのシャッフリング) 水銀解毒のためのオペロンを含むプラスミド pYW333 は、水銀解毒の経路をコードする少なくとも 8 つの遺伝子を含む 15.5 kb のプラスミドであり (Wangら、(1989)

Bacteriol. 171: 83、(これは、本明細書中に参考として援用される))、Prof. Simon Silver (Univ. Illinois, Chicago, IL) から入手した。400~1500 bp のフラグメントを、上述のように得、そして XL-PCR 試薬を用いて再組立した。組立された DNA の *E. coli* TG1 への直接的なエレクトロポレーションの後、細胞を、実施例 15 でヒ酸塩について記載されたのと類似のプロトコル下で、一定の範囲レベルの塩化水銀 (Sigma) 上にプレーティングした。水銀の最初の MIC は、50~70 μM であった。4 サイクルの全プラスミドシャッフリングを行い、そして約 50~70 μM から 1000 μM を超えて水銀に対する細菌耐性として測定された解毒を増大させた (15~20 倍の改善)。

【0535】(実施例 17. カチオン性界面活性剤の添加によるシャッフリング反応の増強) 相補的 DNA 鎖の再生の確率は、シャッフリングする長い複雑な配列を制限ようになる。この再生の確率は、単純なカチオン性界面活性剤の添加より 10,000 倍増強され得る (Pontius および Berg (1991) *PNAS* 88: 8237)。再生は特異的であり、そして 10^6 倍までの過剰な異種 DNA から独立している。これらの薬剤の存在下で、相補的 DNA 鎖が溶液中でそれぞれ他方に遭遇する確率は限定的になる。

【0536】15 kb のプラスミドの組立反応における TMAC の添加、続く *E. coli* へのエレクトロポレーションにより、以下の結果がもたらされた：

【0537】

【表 13】

TMAC (mM)	コロニー数
0	3
15	88
30	301
60	15
90	3

【0538】15 kb のプラスミドの組立反応における CATB の添加、続く *E. coli* へのエレクトロポレーションにより、以下の結果がもたらされる：

【0539】

【表 14】

CATB (mM)	コロニー数
	155
0	3
30	34
100	14
300	0

【0540】(実施例18. 配列シャッフリング対PCRスタックリング(stuttering))スタックリングは、テンプレートの不完全なポリメラーゼ伸長によるフラグメント化である。非常に短いPCR伸長時間に基づく組換え形式を利用して、部分的なPCR産物を作製する。これは、次の(および引き続く)サイクルにおいて異なるテンプレートから伸長し続ける。非常に類似したテンプレート間には強い増殖速度の偏りが存在し、これはこの形式が、複雑なプールへの適用について著しい制限を有することを示す。エアサイクラーのような急速なサイクラーと共に使用する場合、この形式は、より良好に作用し得る。

【0541】PCRスタックリングに用いられるPCRプログラムは、(94℃15秒、60℃15秒)の100サイクルであった。2つの別々のPCR反応を作動させて、2つのGFP-ネガティブの組換えアッセイ基質(GFP stop1およびGFP stop2)のそれぞれを含む1kbのPCRフラグメントを得た。GFP-ポジティブな組換え体のみが、これらの2つのテンプレートの組換えによって得ることができる。5'末端で使用されるオリゴヌクレオチドプライマーは、NheI部位を含む5' TAGCGGATCCTACCTACCTGACGCであり、3'で使用されるオリゴは、EcoRI部位を含む5' GAAAATCTTCTCTCATCCである。PCR反応を、テンプレートとして1ngの各GFP-ネガティブ遺伝子を用いて設定した。Taq PCR試薬を使用し得るが、処理性(processivity)を低下させる誤りがちなPCR条件(Lenug, 1989; CadwellおよびJoyce, 1992)の使用は、GFP-ポジティブの組換え体の割合を増大させ得る。

【0542】94℃10~20秒、60℃10~30秒の50~150サイクルのスタックリングプログラムを、Stratagene Robocyclerで使用了。スタックリングされた(stuttered)PCR産物を、NheIおよびEcoRIを用いて消化し、そしてNheIおよびEcoRIで消化したpBAD18ベクターにクローニングし戻し、そしてE. coliにエレクトロポレーションし、そしてampプレートにプレーティングした。GFP-ポジティブのクローンが2つのGFP-ネガティブDNA配列間での組換えにより生じ、そして検出された。スタックリングにより得られたGFP-ポジティブのコロニーの割合は、0.

1~10%であり、これは条件に依存する。

【0543】合成遺伝子を、天然のアミノ酸配列に基づいて同一の(最適E. coli)コドン使用頻度を用いて、各タンパク質について設計した。このアプローチは、天然に存在する遺伝子に対する合成遺伝子のDNA相同性を増大させ、そしてコドン使用頻度の調節を行わずに可能になるよりも離れて、関連する配列をシャッフリングすることを可能にする。各4つの遺伝子を、30の60マーオリゴおよび6つの40マーから組み立てた。この組立を、Stemmerら(1995; Gene 164: 49-53)により記載される組立(assembly)PCRにより行った。組立後、遺伝子を、ベクターpUC322 Sfi-BLA-Sfi (Stemmerら(1995) Gene 164: 49-53)のSfi部位にクローニングし、そして選択培地にプレーティングした。種々のペータラクトム系抗生物質に対するこれらの4つの構築物の最小阻害活性を確立した。セフォタキシムは、最適化について選択された抗生物質のうちの1つであった。4つの遺伝子を、各遺伝子の1μgのPCR産物をプールすることによりシャッフリングし、続いてこのプールのDNase I消化およびアガロースゲルからの100~300bpフラグメントの精製を行った。精製フラグメントを、最初に外部からのプライマーを用いることなく有性PCRにより再組立し、次いで、完全長産物を外部からのプライマーの存在下で増幅した。Stemmer(1994) Nature 370: 389-391により以前に記載されたように、得られた完全長遺伝子をSfi Iを用いて消化し、そして新鮮なpUC322 Sfi-Sfiベクターに連結し、そして新鮮なE. coli細胞にエレクトロポレーションし、そして漸増濃度のいくつかの抗生物質(セフォタキシムを含む)上にプレーティングした。

【0544】手動シャッフリングPCRプロトコルは、相同が80~90%未満の遺伝子の混合に好ましい。手動PCRは、熱不安定性DNAポリメラーゼ(例えば、DNA pol I Klenowフラグメント)を使用する。最初のPCRプログラムは、10~30ng/μlのKlenow緩衝液中のフラグメントおよびdNTPを含む:

- 1-変性94℃20秒
- 2-迅速な冷却:ドライアイスエタノール5秒、氷15秒
- 3-Klenow酵素添加
- 4-アニール/伸長2分25℃
- 5-変性へサイクルし戻す(サイクル1)

これを、テンプレートスイッチングを開始するために10~20サイクル反復し、この後、熱安定性ポリメラーゼを用いた通常のPCRを、産物量を増幅するためにさらに10~20サイクル続ける。

【0545】(実施例19. 抗体ファージディスプレイライブラリーのシャッフル) 安定なかつ良好に発現するヒト単鎖Fvフレームワーク ($V_H 251-V_L A25$) を、ジフテリア毒素に対する結合についての選択により、天然のヒトmRNAから構築されたAbファージライブラリーから得た。このscFvフレームワークを用いて、生殖系配列に基づく6つの合成的に変異させたCDRを含む天然のAbファージライブラリーを構築した。各残基の変異誘発の程度は、そのV領域ファミリー内のその天然に存在する変異性に類似していた。

【0546】scFv遺伝子を含むPCR産物を、DNase I消化によりランダムにフラグメント化し、そして50~100bpのフラグメントを精製した。合成オリゴヌクレオチド(それぞれ、scFvテンプレートに対して相対的な19bpに隣接した変異CDRを含む)を、10:1モル比でランダムフラグメントに添加した。完全長変異scFv遺伝子のライブラリーを、有性PCRによるフラグメントから再組立した。M13ファージのpIIIタンパク質へのクローニングにより、 4×10^7 プラーク形成単位のAbファージライブラリーが生じた。変異CDRと天然CDRとの組合せを、天然CDRに特異的なプライマーを用いたコロニーPCRにより特徴づけた(図7を参照のこと)。6つ全ての変異CDRが、32~65%の効率および広範な種々の組合せで取り込まれた。変異CDRの配列決定により、観察された変異率が予測した率と適合することを示した。

【0547】このAbファージライブラリーを、10のヒトタンパク質標的への結合について、マイクロタイプレート内で2回選別し(pan)、そしてこれらの標的のうち7つがELISAポジティブクローンを生じた。ポジティブクローンを生じた1つの標的は、ヒトG-CSFレセプターであった。G-CSFレセプターポジティブクローンを、2回目に供し、そして2回目のファージクローンの1/4が、G-CSFレセプターへの結合についてELISAポジティブであった。

【0548】この多様なプールを使用して、3つの異なる配列最適化ストラテジー(従来のPCR、誤りがちなPCR、およびDNAシャッフル)の適合性を評価した。これらの代替物のそれぞれの1サイクルの後、DNAシャッフルは、回収されたAbファージの割合およびG-CSFレセプター特異的ELISAシグナルの両方において、7倍の好結果を示した。選別(panning)をさらに6サイクル続け、各回の後にscFv遺伝子のプールをシャッフルした。選択のストリンジエンシーを、過剰な可溶性G-CSFレセプターの存在下、PBS-Tween中で50℃で2回の1時間洗浄により段階的に増加させた。3~8回目に、ほぼ100パーセントのクローンがELISAポジティブであった。異なるサイクル由来のプールを同じストリンジエンシーでアッセイした場合、結合したファージの割合

は、図31に示すように、サイクル2~8で440倍に増加した。各回由来の個々のファージクローンは、特異的なELISAシグナルにおいて類似の増加を示した。配列決定は、scFvが平均34($n=4$)のアミノ酸変異を含むことを示したが、これらのうち4つのみが評価された全ての配列に存在した。

【0549】潜在的な免疫原性を低減させるために、天然のまたは寄与の弱い変異を、40倍過剰の合成的に構築した生殖系scFv遺伝子を用いて2サイクル戻し交配し、続いてストリンジレントな選別することにより取り除いた。戻し交配されたscFvにおけるアミノ酸変異の平均的な数を、ほぼ半分の18($n=3$)にした。が、これらのうち4つのみが全ての配列に存在した。戻し交配されたAbファージクローンは、強力にかつ優れた特異性でヒトG-CSFレセプターに結合することが示された。図32は、いくつかのヒトタンパク質標的の10回の選択の効果を示す; 6回のシャッフルおよび2回の戻し交配を行った。図33は、従来のPCR(「シャッフルしていない」)、誤りがちなPCR、または反復的配列組換え(「シャッフルした」)の後の、BSA、Ab 179、またはG-CSFレセプターを用いる選別による、ファージの相対的な回収率を示す。

【0550】(実施例20. 哺乳動物細胞におけるGFPの最適化) プラスミドベクターpCMV-GFP(これは、GFPをコードしそしてCMVプロモーターの制御下でそれを発現させる)を、TG1細胞内で増殖させ、そしてこれを用いて、一過性発現アッセイのためにCHO細胞をトランスフェクトした。

【0551】プラスミドを、プロテイナーゼK法またはPreTaq法(Gibco/BRL)により、FACS選択された一過性発現TG1細胞からレスキューした。基本的には、FACS回収細胞を遠心分離によりペレット化し、反復的に凍結融解し、プロテイナーゼKまたはPreTaqのいずれかとインキュベートし、フェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈澱させ、これを使用してE. coliを形質転換し、次いでこれをAmpプレートにプレーティングした。結果は:

プロテイナーゼK法: 投入量- 5×10^4 レスキュー
 3×10^4

PreTaq法: 投入量- 5×10^4 レスキュー
 2×10^4 。

【0552】レスキューされたプラスミドを増殖させ、そして5μgをDNase Iを用いて部分的に消化し、そして50~700bpのフラグメントをゲル精製し、エタノール沈澱し、そして330μlの3.3×PCR緩衝液、44μl Mg(OAc)₂(Perkin-Elmer)、193μl 40%PEG、80μl 10mM dNTP、20μl Tthポリメラーゼ、2μl Pfuポリメラーゼ、7μl TMAC(Sigma)、および367μl H₂O中に再懸濁

した。PCRを、MJ Research PTC-1 50ミニサイクラーで、3セットのプライマーを用いて40サイクル(94℃、30秒; 50℃、30秒; 72℃、60秒)行い、これにより3つの末端重複PCRフラグメントが生じ、消化および連結と共におよびこの後に、完全なプラスミドを再構築した。PCRフラグメントを、A1wN1を用いて消化し、そしてこのフラグメントをゲル精製し、連結し、そしてTG1細胞にエレクトロポレーションした。プラスミドDNAを調製し、そしてCHO細胞にエレクトロポレーションした。これを、最も明るいGFPシグナルを一過的に発現する細胞

について、FACSによりスクリーニングした。

【0553】本発明は、好適な実施態様を考えられるものに関して記載されているが、本発明が開示された実施例に制限されないことが理解されるべきである。反対に、本発明は、添付された請求の範囲の精神および範囲内に包含される種々の改変および同等の組立を包含することが意図されている。

【0554】(参考文献)以下の参考文献は、本願の関連部分で本願において引用される。

【0555】

【表15】

1. Holland, J. H. (1992) *Sci. Am.* July, 66-72.
2. Holland, J. H. (1992) "Adaptation in natural and artificial systems". Second edition, MIT Press, Cambridge.
3. Joyce, G. F. (1992) *Scientific American*, December, 96-97.

【0556】

【表16】

4. Kauffman, S. A. (1993) "The origins of order". Oxford University Press, New York.
5. Stormo, G. D. (1991) *Methods Enzymol.* 208:458-468.
6. Schneider, T. D. (1986) *J. Mol. Biol.* 188:415-431.
7. Reidhaar-Olson, J. F. & Sauer, R.T. (1988) *Science* 241:53-57.
8. Stemmer, W. P. C. (1992) *Biotechniques* 14:256-265.
9. Yockey, H. P. (1977) *J. Theor. Biol.* 67:345-376.
10. Yockey, H. P. (1974) *J. Theor. Biol.* 46:369-380.
11. Leung, D. W. (1989) *Technique* 1:11-15.
12. Caldwell, R. C. & Joyce, G. F. (1992) *PCR Methods and Applications* 2:28-33.
13. Bartel, D. P., & Szostak, J. W. (1993) *Science* 261:1411-1418.
14. Bock, L. C. (1992) *Nature* 355:564-566.
15. Scott, J. K. & Smith, G. P. (1990) *Science* 249:386-390.
16. Cwirla, S. E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382.
17. McCafferty, J. (1990) *Nature* 348:552-554.
18. Cull, M. G. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869.
19. Gramm, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580.
20. Arkin, A. & Youvan, D. C. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815.
21. Oliphant, A. R. (1986) *Gene* 44:177-183.
22. Hermes, J. D. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:696-700.
23. Meyerhans, A. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:1687-1691.
24. Osterhout, J. J. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:331-337.
25. Cano, R. J. (1993) *Nature* 363:536-538.
26. Palzkill & Botstein, (1992) *J. Bacteriol.* 174:5237-5243.

27. Marton $\bar{\zeta}$, *Nucleic Acids Res.* 19:2423.
28. Yanish-Perron $\bar{\zeta}$, [1985] *Gene* 33:103-119.
29. Watson (1988) *Gene* 70:399-403.
30. Ambler $\bar{\zeta}$ (1991) *Biochem J.* 276:269-272.
31. Chen $\bar{\zeta}$ Clowes, (1984) *Nucleic Acid Res.* 12:3219-3224.
32. Witholt, B. ([1987] *Anal. Biochem.* 164(2):320-330
33. Kabat $\bar{\zeta}$, (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest" U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication 91-3242.
34. Philippon $\bar{\zeta}$, (1989) *Antimicrob Agents Chemother* 33:1131-1136.
35. Jacoby $\bar{\zeta}$ Medeiros (1991) *Antimicrob. Agents Chemther.* 35:167-1704.
36. Coelhosampaio (1993) *Biochem.* 32:10929-10935
37. Tuerk, C. $\bar{\zeta}$, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6988-6992.
38. 米国特許出願第 4,683,195 号
39. 米国特許出願第 4,683,202 号
40. Delagrave $\bar{\zeta}$ (1993) *Protein Engineering* 6: 327-331
41. Delgrave $\bar{\zeta}$ (1993) *Bio/Technology* 11: 1548-1552
42. Goldman, ER $\bar{\zeta}$ Youvan DC (1992) *Bio/Technology* 10:1557-1561
43. Nissim $\bar{\zeta}$ (1994) *EMBO J.* 13: 692-698
44. Winter $\bar{\zeta}$ (1994) *Ann. Rev. Immunol.* 12: 433-55
45. Caren $\bar{\zeta}$ (1994) *Bio/Technology* 12: 517-520
46. Calogero $\bar{\zeta}$ (1992) *FEMS Microbiology Lett.* 97: 41-44
47. Galizzi $\bar{\zeta}$ WO91/01087
48. Hayashi $\bar{\zeta}$ (1994) *Biotechniques* 17: 310-315
49. Radman $\bar{\zeta}$ WO90/07576

【0558】全ての刊行物、特許、および特許出願は、それぞれ個々の刊行物、特許、または特許出願が特別にかつ個々にその全体が参考として援用されると示される場合と同じ程度に、本明細書中においてそれらの全体が参考として援用される。1995年2月17日に出願され、そしてWO95/22625として1995年8月24日に公開されたPCT/US95/02126は、本明細書中に参考として援用される。同時係属出願代理人事件整理番号16528A-0196は、本明細書中に参考として援用される。

【0559】本願発明は、ランダムなフラグメント化後のDNA再組立の方法、およびインビトロまたはインビボでの組換えによる核酸配列の変異誘発へのその適用が記載される。詳細には、変異タンパク質をコードする核酸フラグメントまたはポリヌクレオチドを生成する方法が記載される。本発明はまた、タンパク質のインビトロ

またはインビボでの指向された分子進化を可能にする、変異誘発、シャッフリング、および選択のサイクルを繰り返す方法に関する。

【0560】

【発明の効果】変異タンパク質を生成する方法を開発することは有益であり、本方法により、容易にサーチされる変異核酸配列の大規模ライブラリーの開発が可能になった。本明細書に記載の発明は、点変異誘発、核酸シャッフリングおよび選択の反復サイクルの使用に関し、本発明によって、タンパク質のような高度に複雑な直線配列のインビトロにおける直接的な分子進化が、ランダム組換えによって可能になった。

【0561】本発明によって、変異DNA、RNAまたはタンパク質の大規模ライブラリーの生成を可能にする方法、および所望の目的のために特定の変異体を選択することが可能になった。本明細書中に記載の発明は、D

NA、RNAまたはタンパク質のような高度に複雑な直線配列のインビボおよびインビトロにおける直接分子進化を、組換えによって可能にする変異誘発、インビボ組換えおよび選択の反復サイクルの使用に関する。

【0562】本発明のさらなる利点については、添付の図面を参考にして、本発明の以下の記載から明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、変異誘発性シャッフリングと誤りがちなPCRとを比較する模式図である；(a)最初のライブラリー；(b)1回目の親和性選択において選択された配列のプール；(d)選択された配列のインビトロにおける組換え（「シャッフリング」）；(f)シャッフリング後の2回目の親和性選択において選択された配列のプール；(c)誤りがちなPCR；(e)誤りがちなPCR後の2回目の親和性選択において選択された配列のプール。

【図2】図2は、10bp～50bpのランダムフラグメントからの1.0kb LacZ α 遺伝子フラグメントの再組立(reassembly)を示す写真である。(a)LacZ α 遺伝子を有するPCR増幅したゲルDNAフラグメントの写真。(b)DNase I消化後のDNAフラグメントのゲルの写真。(c)消化されたLacZ α 遺伝子DNAフラグメントから精製した10bp～50bpのDNAフラグメントのゲルの写真；(d)指示された数のサイクルのDNA再組立後の10bp～50bpのDNAフラグメントのゲルの写真；(e)プライマーを用いたPCRによる増幅後の組換え混合物のゲルの写真。

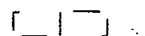
【図3A】図3Aは、LacZ α 遺伝子の終止コドン変異体およびそれらのDNA配列の模式図である。四角枠の領域は非相同範囲であり、マーカーとして働く。終止コドンはより小さな四角枠内に位置するかまたは下線を付している。「+」は、野生型遺伝子を示し、そして「-」は遺伝子における変異範囲を示す。

【図3B】図3Bは、LacZ α 遺伝子の終止コドン変異体およびそれらのDNA配列の模式図である。四角枠の領域は非相同範囲であり、マーカーとして働く。終止コドンはより小さな四角枠内に位置するかまたは下線を付している。「+」は、野生型遺伝子を示し、そして「-」は遺伝子における変異範囲を示す。

【図4】図4は、合成オリゴヌクレオチドをLacZ α 遺伝子の再組立プロセスへの導入またはスパイク(spiking)の模式図である。

【図5A】図5Aは、E. coliのコドン使用頻度を用いて、マウスIL1-B遺伝子(M)とヒトIL1-B遺伝子(H)との間の相同な領域を示す模式図である。非相同領域には四角枠を付す。

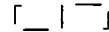
【化2】



は、2つの遺伝子のシャッフリングの際に得られる交差を示す。

【図5B】図5Bは、E. coliのコドン使用頻度を用いて、マウスIL1-B遺伝子(M)とヒトIL1-B遺伝子(H)との間の相同な領域を示す模式図である。非相同領域には四角枠を付す。

【化3】



は、2つの遺伝子のシャッフリングの際に得られる交差を示す。

【図6】図6は、抗ウサギIgG抗体(A10B)のscFvを使用した抗体CDRシャッフリングモデルシステムの模式図である。

【図7】図7(パネルA～D)は、scFvのシャッフリングしたDNAにおける、観察されたCDRの特定の組み合わせが生じる頻度を示す模式図である。パネル(A)は、全6個の合成CDRの長さおよび変異誘発率を示す模式図である。パネル(B)は、全6個のCDRを有するscFvのシャッフリングによる、ライブラリー構築物を示す模式図である。パネル(C)は、天然のCDRについてプライマーを用いるPCRにより決定されるCDR挿入を示す模式図である。パネル(D)は、合成CDR挿入物の挿入率および分布を示す模式図である。

【図8】図8は、DNAシャッフリングおよび選択の各サイクルの後のscFv抗ウサギ抗体の改善された結合活性を示すグラフである。

【図9】図9は、pBR322-Sfi-BL-LA-Sfiおよび直列反復を介するインビボでのプラスミド内の組換え、ならびに機能的な β ラクタマーゼ遺伝子を再構築するプラスミド内の組換えによるアンピシリン耐性コロニーの発生率を模式的に示す図および表である。

【図10】図10は、pBR322-Sfi-2Bla-Sfiおよび直列反復を介するインビボでのプラスミド内の組換え、ならびに機能的な β ラクタマーゼ遺伝子を再構築するインビボにおけるプラスミド内の組換えによるアンピシリン耐性コロニーの発生率を模式的に示す図および表である。

【図11】図11は、組換えタンパク質を生成するために、ポリヌクレオチドフラグメントを細胞に導入した後、複数回の相同組換えの効率を試験するための方法を示す表である。

【図12】図12は、以下の遺伝子座でのカセットのシャッフリングによるベクターのライブラリーの生成を概略する模式図である：プロモーター、リーダーペプチド、ターミネーター、選択薬物耐性遺伝子、および複製開始点。各遺伝子座での複数の平行な線はそのカセットについてカセットの多様性を表す。

【図13】図13は、シャッフリングにより原核生物のベクターライブラリーを構築するために、種々の遺伝子座での適切なカセットのいくつかの例を模式的に示す図

である。

【図14】図14は、pBAD18 (Guzmanら (1995) J. Bacteriol. 177: 4121) から誘導された原核生物GFP発現ベクター pBAD-GFP (5,371bp) を示す図である。真核生物GFP発現ベクター- α +GFP (7,591bp) は、ベクター- α (Whitehornら (1995) Bio/Technology 13: 1215) から誘導された。

【図15A】図15Aは、全てのE. coli細胞における別のGFP構築物の蛍光の比較を示すグラフである。24アミノ酸のN-末端伸長を含む「Clontech」構築物、Affymax野生型構築物(「wt」、改善されたコドン使用頻度を有する)、ならびに有性PCRおよび選択の2および3サイクル後に得られた変異体(「サイクル2」、「サイクル3」)が比較される。「Clontech」構築物はIPTGを用いて誘導されたが、他の構築物はアラビノースを用いて誘導された。全てのサンプルを同じOD600でアッセイした。この図は、蛍光スペクトルを示し、これは、「wt」構築物からの全細胞の蛍光シグナルが、「Clontech」構築物よりも2.8倍大きいことを示す蛍光スペクトルを示す。「サイクル3」変異体のシグナルは、Affymax「wt」より16倍、「Clontech」wt構築物より45倍増大する。

【図15B】図15Bは、全てのE. coli細胞における別のGFP構築物の蛍光の比較を示すグラフである。24アミノ酸のN-末端伸長を含む「Clontech」構築物、Affymax野生型構築物(「wt」、改善されたコドン使用頻度を有する)、ならびに有性PCRおよび選択の2および3サイクル後に得られた変異体(「サイクル2」、「サイクル3」)が比較される。「Clontech」構築物はIPTGを用いて誘導されたが、他の構築物はアラビノースを用いて誘導された。全てのサンプルを同じOD600でアッセイした。この図は、E. coliにおけるGFP構築物の励起スペクトルの比較である。このピーク励起波長は、選択された変異体によって変化しない。

【図16】図16は、相対的なGFPタンパク質発現レベルのSDS-PAGE分析を示す写真である。パネル(a):野生型、GFPのサイクル2変異体もしくはサイクル3変異体を発現する全E. coli細胞の等量(OD600)の12%トリスグリシンSDS-PAGE分析(Novex, Encinitas, CA)。クマシーブルーで染色した。GFP(27kD)は総タンパク質の約75%を示し、そして選択は発現レベルを増大させなかった。パネル(b):E. coli画分の等量(OD600)の12%トリスグリシンSDS-PAGE分析(Novex, Encinitas, CA)。レーン1:wt GFPを発現する溶解した細胞のペレ

ット;レーン2:wt GFPを発現する溶解した細胞の上清。wt GFPのほとんどは封入体中に存在する;レーン3:サイクル3変異体GFPを発現する溶解した細胞のペレット;レーン4:サイクル3変異体GFPを発現する溶解した細胞の上清。wt GFPのほとんどは可溶性である。最後に封入体中にあるGFPは発色団を含まない。なぜなら、この画分中に検出可能な蛍光が存在しないからである。

【図17】図17は、野生型GFPに対する、サイクル2およびサイクル3変異体の変異分析を示す図である。パネル(A)は、変異がトリペプチド発色団の近くに集合するよりもむしろ拡散していることを示す。変異F100S、M154T、およびV164Aは、より多くの親水性残基での疎水性残基の置換を含む。増大した親水性は、凝集および封入体形成に向かうよりも、天然の折り畳み経路へのこのタンパク質の誘導を補助し得る。パネル(B)は、発色団領域および導入された変異部位を示す制限マップを示す。

【図18A】図18Aは、別のGFPタンパク質を発現するCHO細胞の比較を示すグラフである。別のGFP変異体を発現するCHO細胞のクローンのFACS分析を示す。

【図18B】図18Bは、別のGFPタンパク質を発現するCHO細胞の比較を示すグラフである。別のGFP変異体を発現するCHO細胞のクローンの蛍光分光学を示す。

【図19】図19は、ヒ酸塩解毒経路オペロンを含有するpGJ103プラスミドのシャッフリングの結果としてのヒ酸塩の毒性に対する耐性の増大を示すグラフである。

【図20】図20は、配列同一性を欠失し得る複数のエキソン種(ランダム配列エキソンとして例示される)の組換えのための基礎として、合成の、または天然に存在するイントロン配列を用いる組合せライブラリーの生成を模式的に示す図である。ここで、相同時および/または部位特異的組換えは、別のライブラリーのメンバーのイントロン配列間で生じる。

【図21】図21は、エキソンをシャッフリングするための方法の改変を模式的に示す図である。パネル(A)に示すように、数字はリーディングフレームを示す。パネル(B)は、それらの個々のスプライシングフレームに対するイントロンおよびエキソンの種々のクラスを示す。パネル(C)は、シャッフリングに適切な天然に存在する遺伝子(免疫グロブリンV遺伝子)の例を提供する。パネルD-Fは、複数のエキソンがイントロンセグメントにまたがるプライマーを用いるPCRを通じてどのように鎖状体化され得るかを示し、その結果、所望される場合は、適切なスプライシングフレームが維持される。パネル(G)は、エキソンのシャッフリングプロセスを例示する(IG:免疫グロブリンエキソン;IF

N: インターフェロンエキソン)。

【図22】図22は、いくつかのヒト遺伝子に対するエキソンスプライシングフレーム図を模式的に示す図である。これはエキソンのシャッフリングに好ましいユニットが同じスプライシングフレームで開始され、そして終結され、その結果スプライシングモジュール（またはシャッフリングエキソン）が複数の天然に存在するエキソンを含み得るが、代表的には各末端で同じスプライシングフレームを有さないことを示す。

【図23】図23は、多重交差を示すキメラのライブラリーを生じる、反復配列組換え（シャッフリング）を提供するために、部分的なPCR伸長（スタックリング）がどのように使用され得るかを模式的に示す図である。

【図24】図24は、シャッフリングを通じて最適な変異のセットを生成するために、どのようにスタックリングを用いて多重変異した配列を有する野生型配列をシャッフリングし得るかを示す図である。

【図25】図25は、複数のプラスミド種を示す細胞集団のエレクトロポレーションによるプラスミドープラスミド組換えを模式的に示す図である。これは、エレクトロポレーションの前に細胞当たり単一のプラスミド種として、そして細胞集団のエレクトロポレーションに続く

インビボの組換えに適切な細胞あたり複数のプラスミド種として最初に存在する複数のプラスミドを示す。

【図26】図26は、プラスミドープラスミド組換えを示す図である。

【図27】図27は、プラスミドーウイルス組換えを示す図である。

【図28】図28は、ウイルスーウイルス組換えを示す図である。

【図29】図29は、プラスミドー染色体組換えを示す図である。

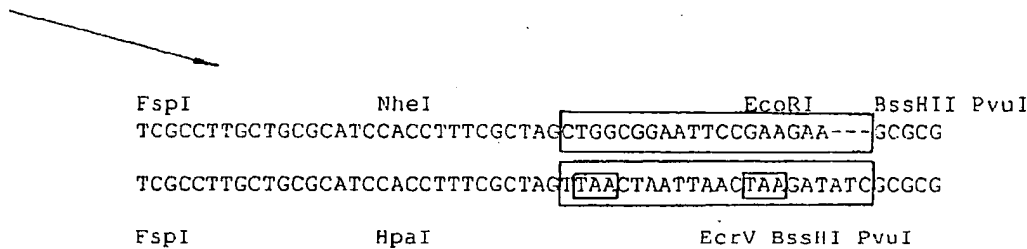
【図30】図30は、結合ー媒介性組換えを示す図である。

【図31】図31は、選択サイクルに対するA b-ファージ回収率を示すグラフである。シャッフリングは、2～8回の選択回後に適用された。全ての増大は440倍である。

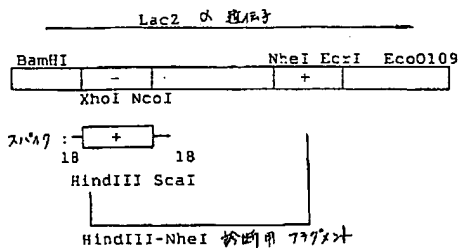
【図32】図32は、2回の戻し交配を含む10回の選択回後の結合特異性を示すグラフである。8つのヒトタンパク質標的についての別のA b-ファージクローンのELISAシグナル。

【図33】図33は、変異誘発方法に対するA b-ファージの回収を示すグラフである。

【図3B】



【図4】



【図8】

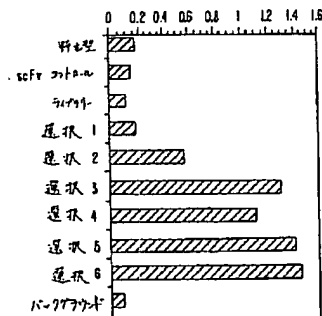
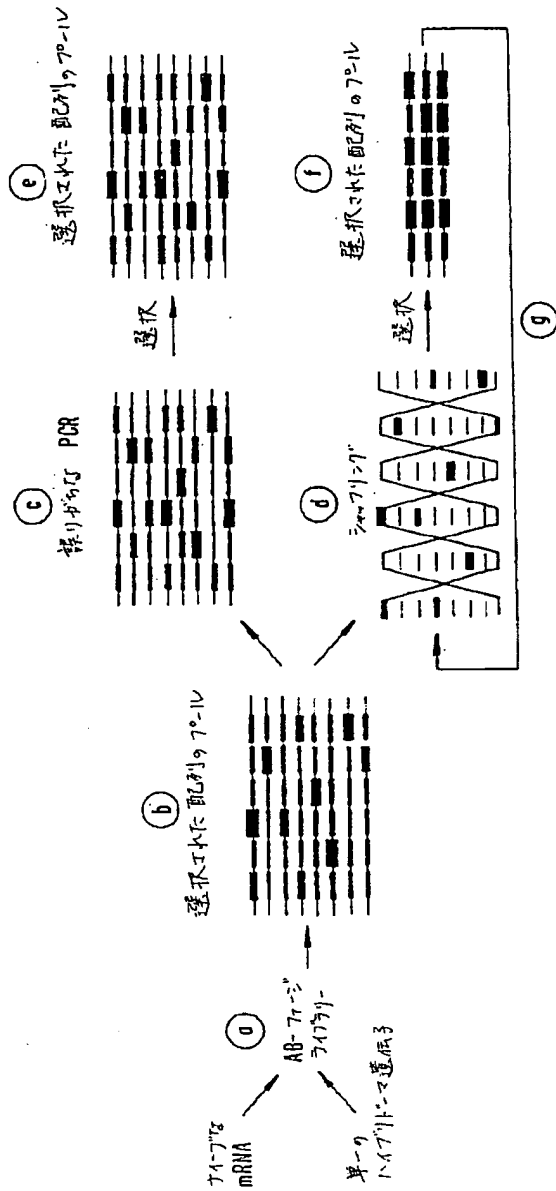
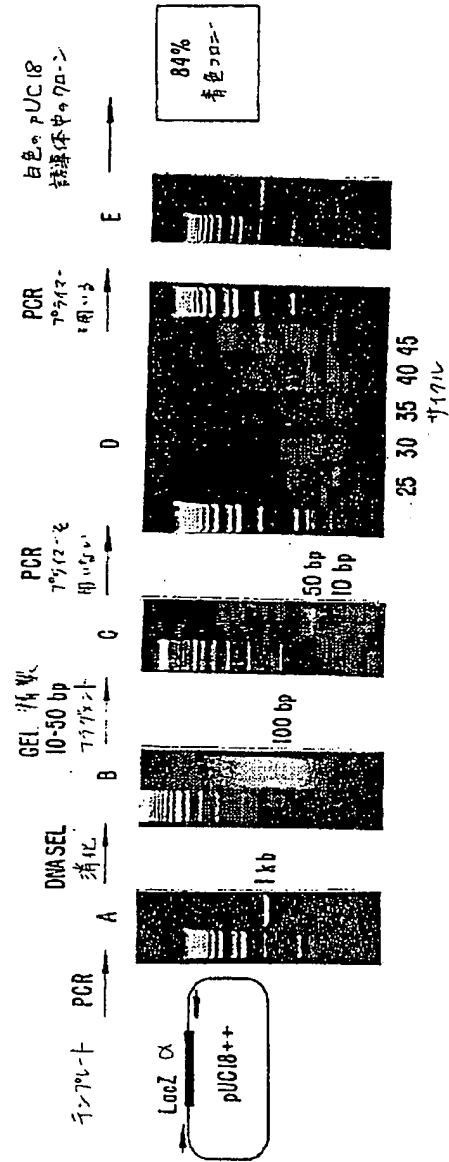


図 974

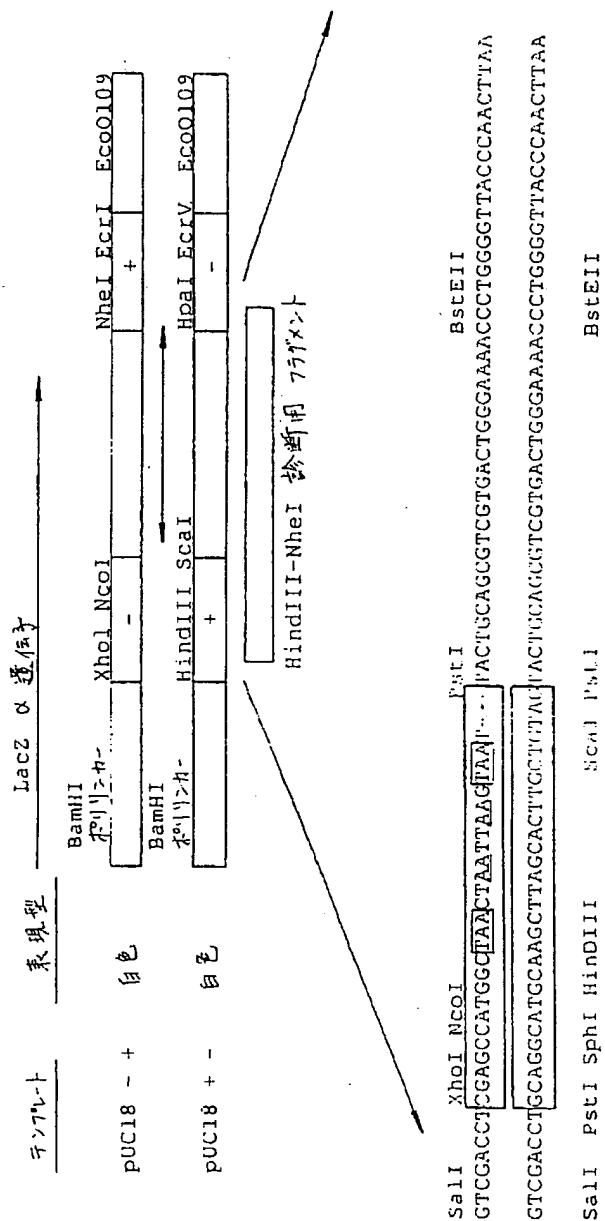
【図1】



【図2】



【図3A】



【図5A】

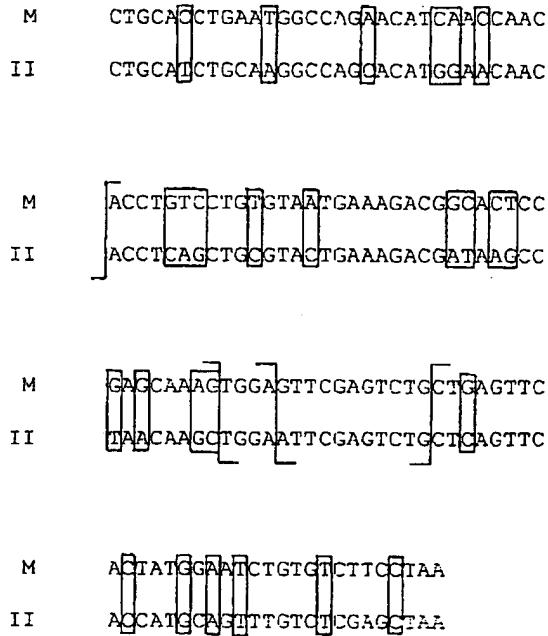
M ATGGTTCCGATTCGTCAGCTGCACTACCGTCTGCGTAAATCAACACACAGAAAGGCTGGTCTCTCTCCGACCCGTACGAATCTGAAGCT
 II ATGGCAACCGGTTAGATCTCTGAACTGCAACCTTTCTGAACTCCGACACAGAAAGGCTTGTCTCTCTCCGACCCGTACGAATCTGAAGCT

M AGGTGATTTCTCCATGAGCTTCGTACAAAGGTGATCAAGGACGACAAATATCCCTGGTCTGAAAGGTAATAAATCTGT
 II AGGTGATTTCTCCATGAGCTTCGTACAAAGGTGATCAAGGACGACAAATATCCCTGGTCTGAAAGGTAATAAATCTGT

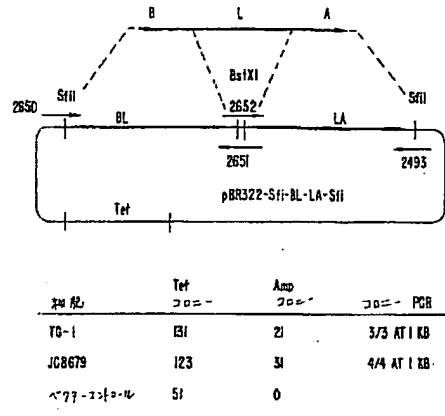
M GACCTGCAACTCGAGAGCGTGGACCCCAAAATATCTCTAACTAAGANATGGAGAACGCTTTCGTCTTCAACAAGATCGAAGTCAA
 II GACTCTGCAGCTTGAATCGTGGACCCCAAAATATCTCTAACTAAGANATGGAGAACGCTTTCGTCTTCAACAAGATCGAAGTCAA

M CCAACTGGTACATCAGCACTCCCAAGCCAGAGCAAAAGCCCTGTTTCTCTGG...TACAACTCCGGTCAGGATATCATCGACTTC
 II CCAACTGGTACATCAGCACTCCCAAGCCAGAGCAAAAGCCCTGTTTCTCTGG...TACAACTCCGGTCAGGATATCATCGACTTC

【図5B】

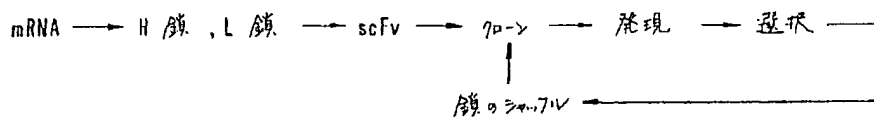


【図9】

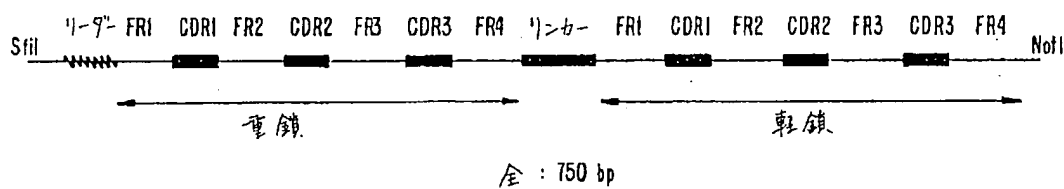


【図6】

A10B = 抗-R-IgG 抗体 (PHARMACIA) の scFv



scFv 構造

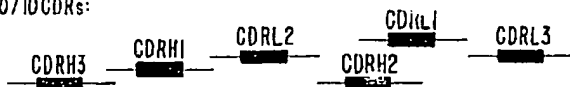


最初の実験 :

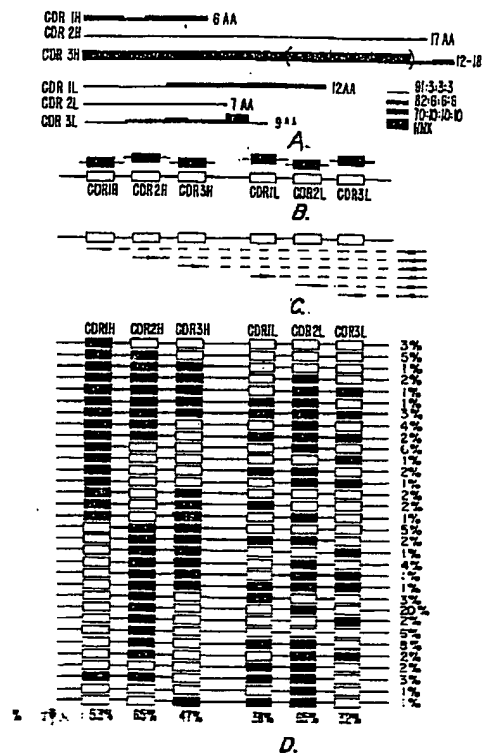
A10BscFv



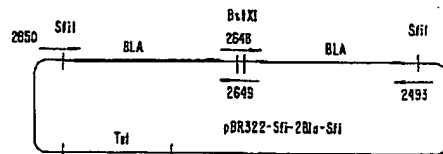
70/10/10/10 CDRs:



【図7】

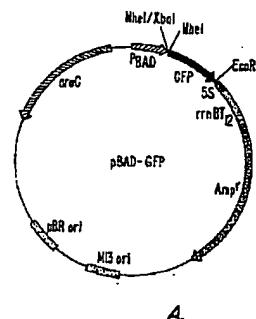


【図10】

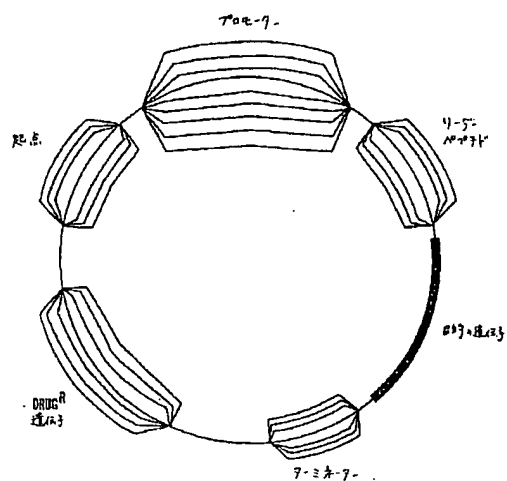


科目別	特 種	普 通	PCR
TC-1	28	54	7/7 AT 1 KB
JC8679	149	117	3/3 AT 1 KB
アゲアゲコンパイル	51	0	

【図14】



【图 12】



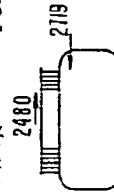
B.

【図11】

イテロチ	AMP コニ	AMP TET コニ	% 相同相換え	コメント
1- 切断したベクター 1 イテロチ JC8679	4,000	1,500	100% (N=14)	同時エレクトロポレーションされたベクター を用いる 相同相換えによる初期挿入 挿入 173グランドより100倍少ない比率
2- 切断したベクター 2 イテロチ JC8679	2,000	16	100% (N=2)	相同挿入は遊離末端に依存する
3- 切断したベクター 1 イテロチ JC8679	16	0		ベクターが細胞内に存在している場合、 切断されていないベクターにはより高い 高い効率がある
4- ベクターなし 1 イテロチ JC8679::pUCSfi-Sfi	5,000	10,000	70% (N=1)	- リボソーム： 染色体への非相同的挿入
5- ベクターなし 1 イテロチ JC8679	2,000	0		- コントロール： AMP ベクターの挿入
6- 切断したベクター イテロチなし JC8679	N.D.	0		

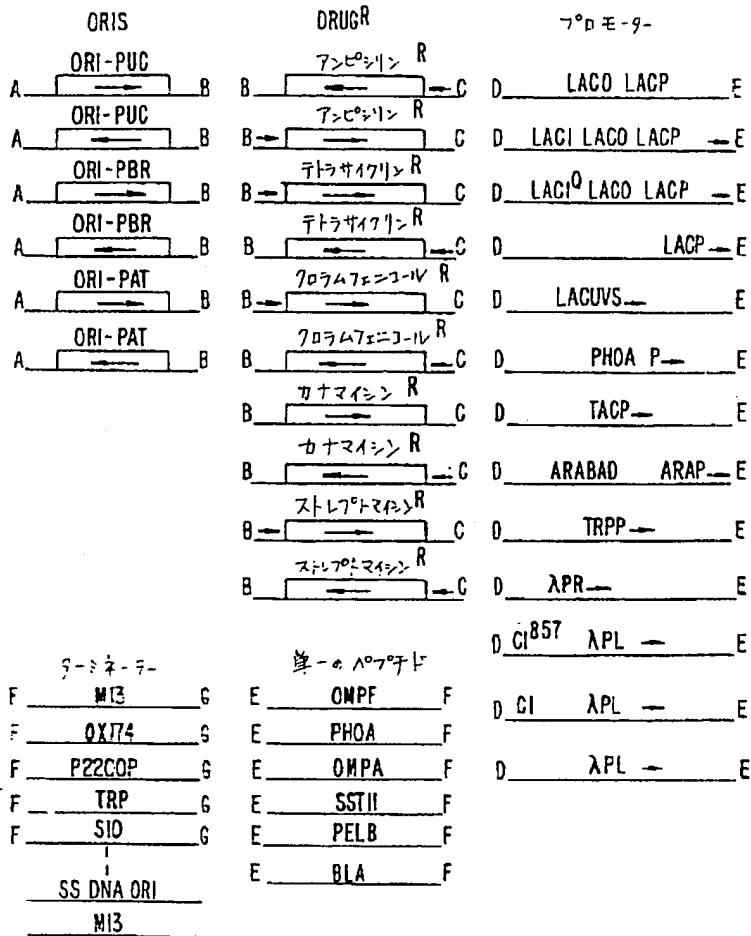
A.

相同相換えコニ - PCR:

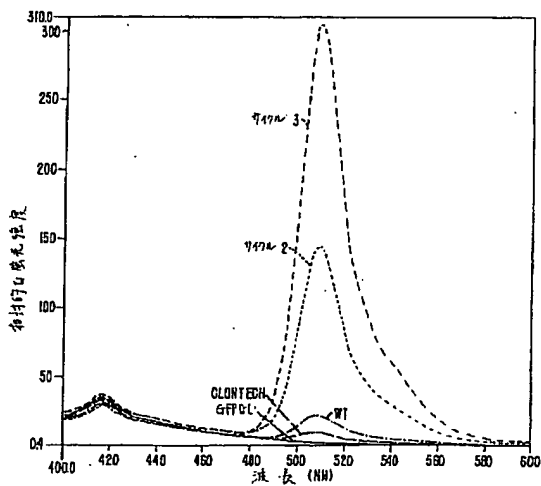


B.

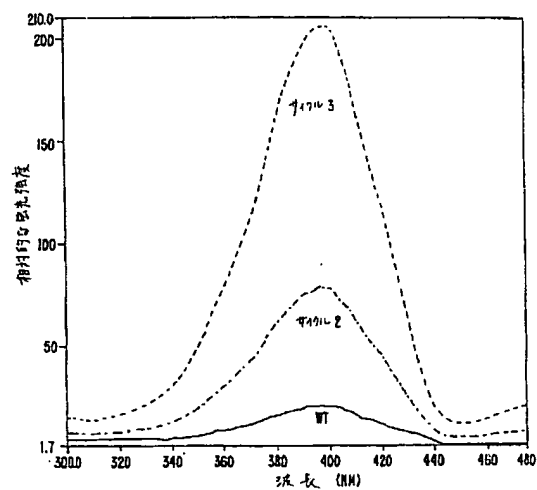
【図13】



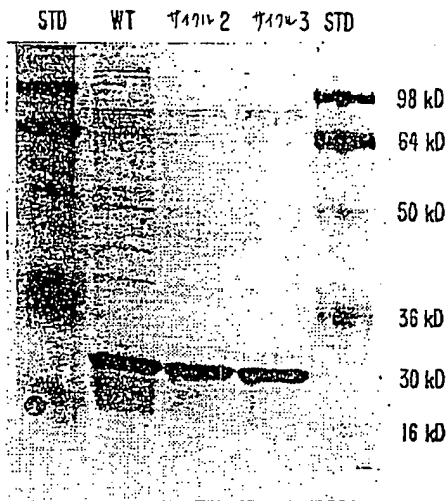
【図15A】



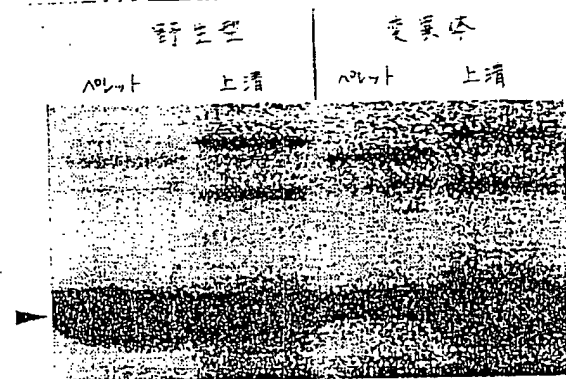
【図15B】



【図16】

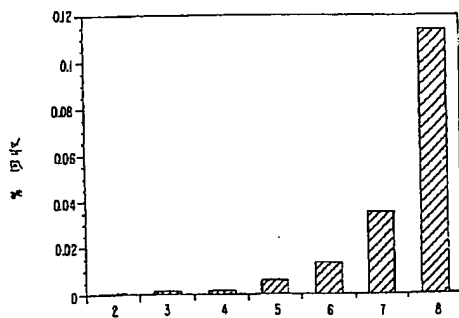


A.

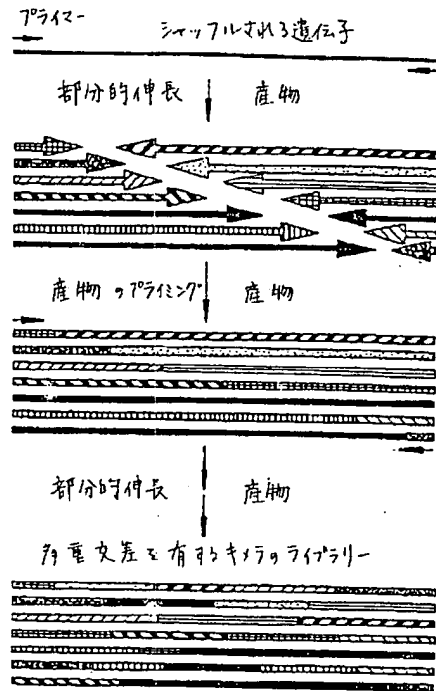


B.

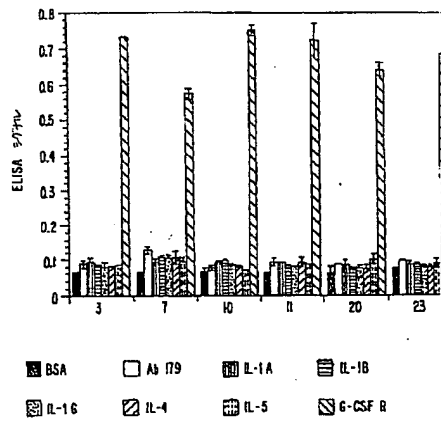
【図31】



【図23】



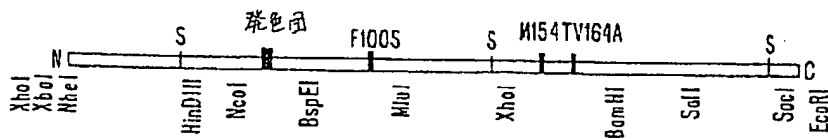
【図32】



【图17】

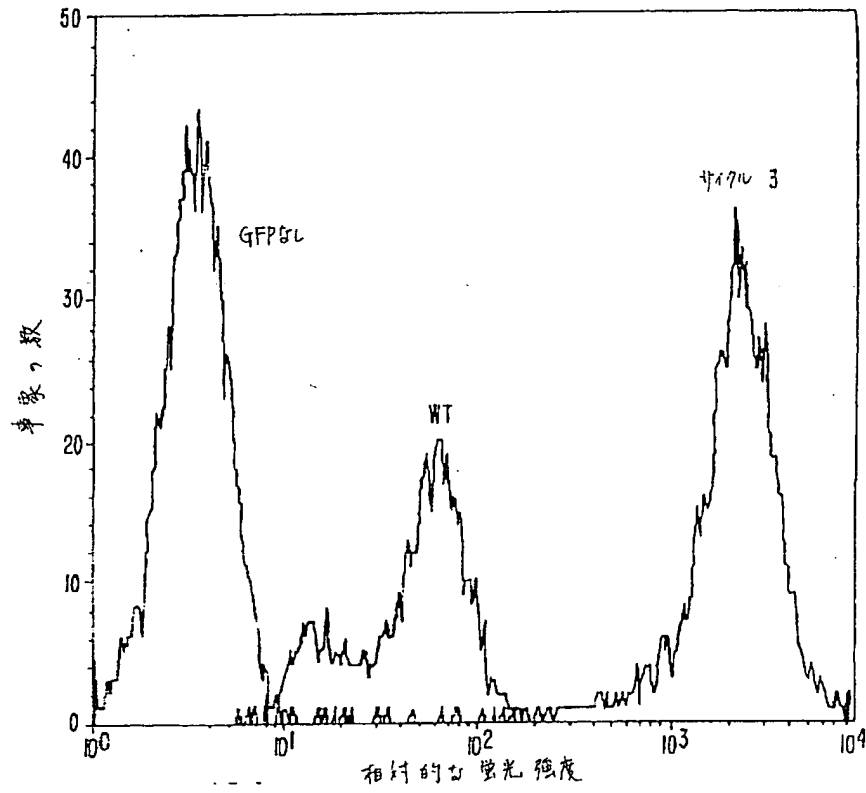
	野生型	甘氨酸 1	甘氨酸 2	甘氨酸 3
38	GCA A	GCT A	GCT A	GCT A
68	GGT G	GGC G		
72	TTT F	TTC F		
73	ICC S	CCC P		
100	TTT F	TCT S	TCT S	TCT S
127	AAA K	GAA E		
A.A. 残基	138	CTT L	CTC L	CTC L
	147	AAC N	TAC Y	
	154	ATG M	ACG T	ACG T
	161	GGA G	GGC G	
	164	GTT V	GCT A	GCT A
	185	CAA Q	CGA R	
	226	ACA T	ACT T	ACT T
	235	GAG E	GAC D	

A.

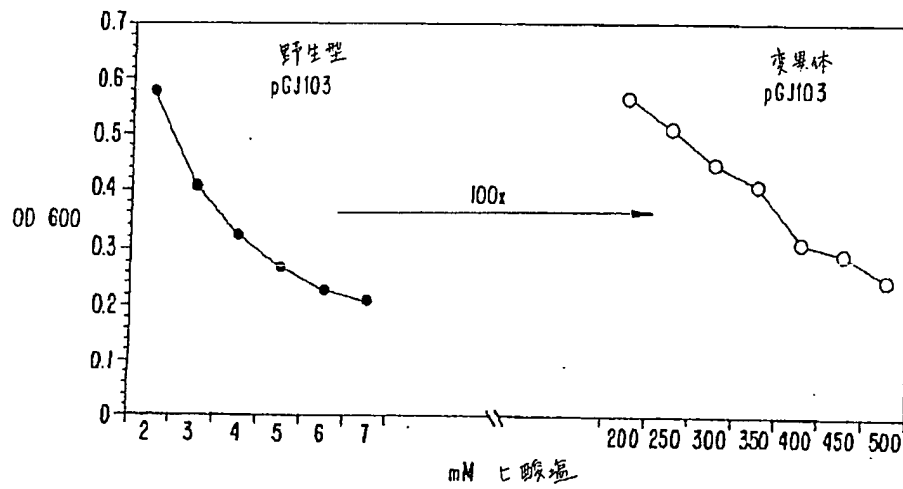


B.

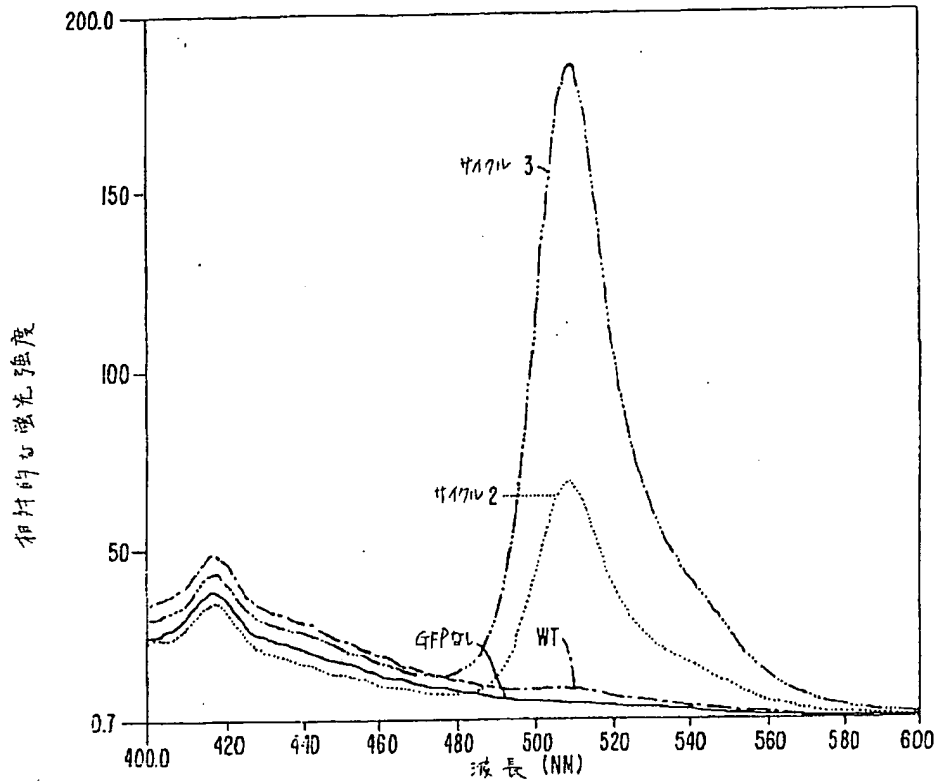
【図18A】



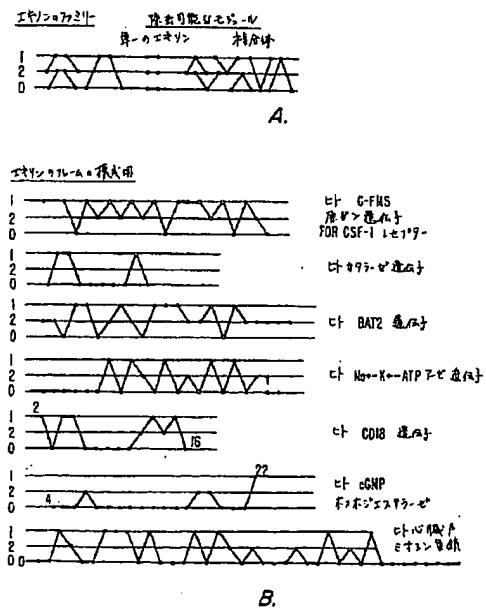
【図19】



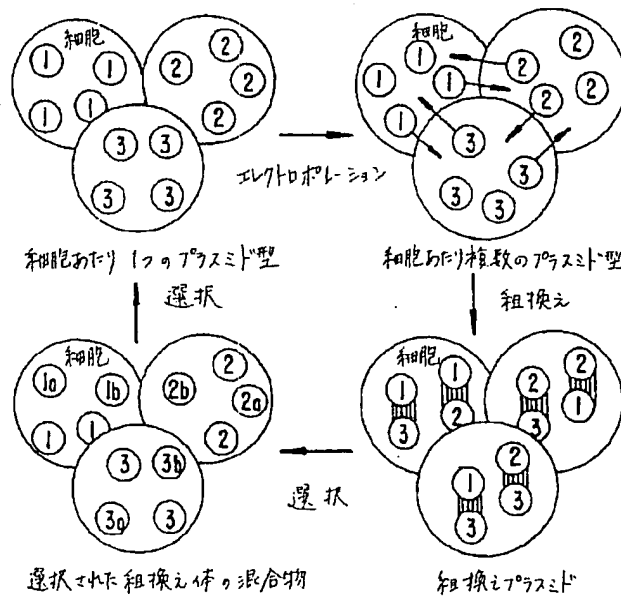
【図18B】

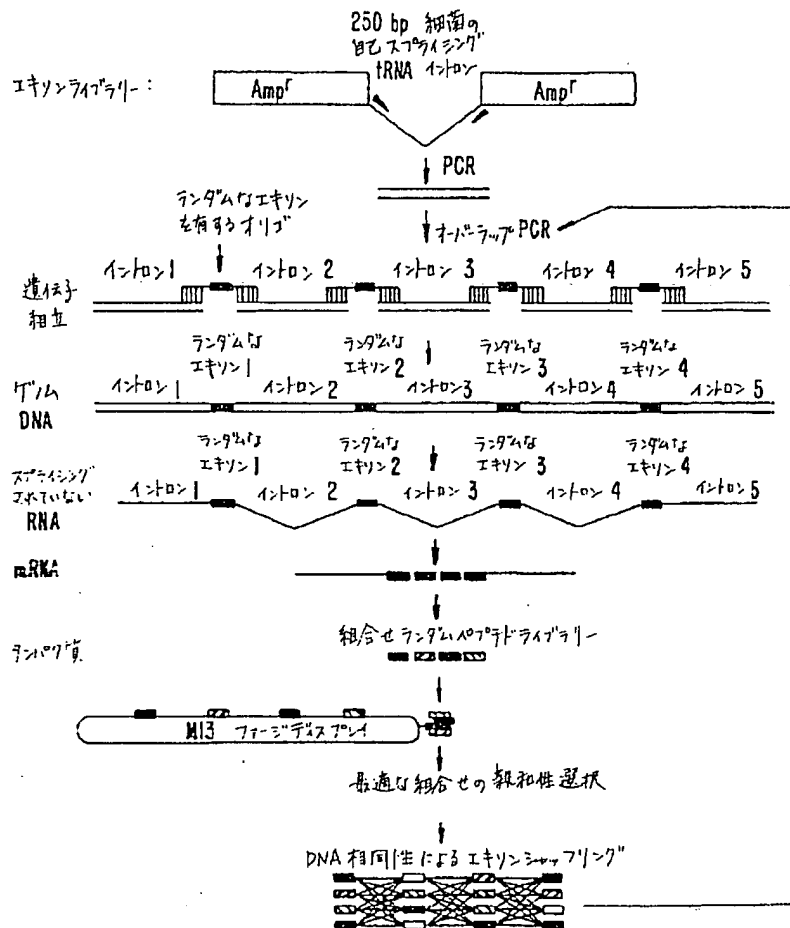


【図22】

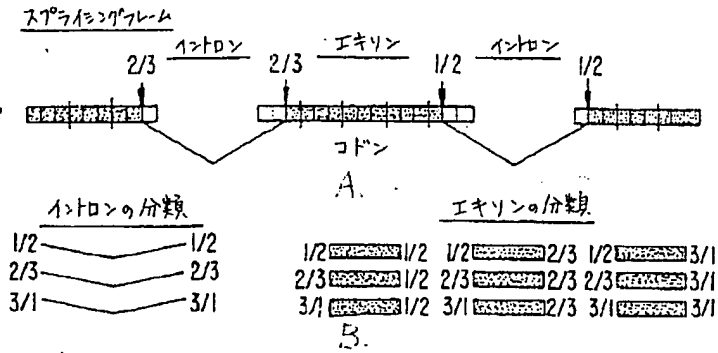


【図25】





【图 21】



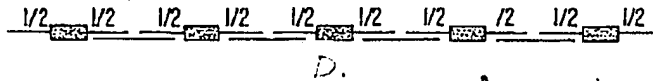
エキソンのファミリーの例

免状 70712

1/2 87903229 1/2

エキソンのライブラリー

179Eキリン9777



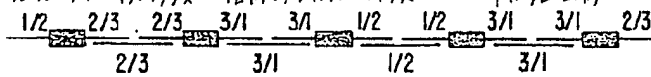
混合されたイキソンのガス - テンダム

(1/9)ⁿ 72-491

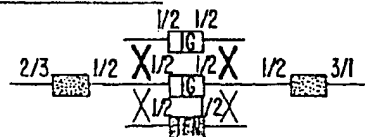


混合されたエキソメリス - 指向性メリスのメリス

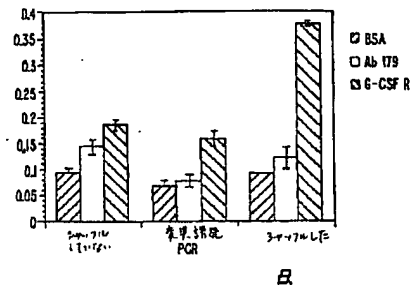
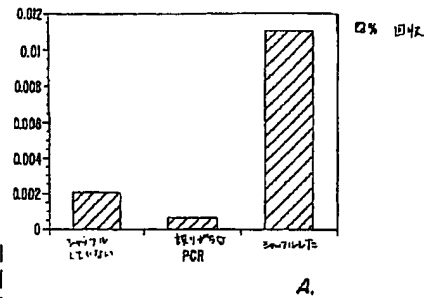
第1: 7L-4内



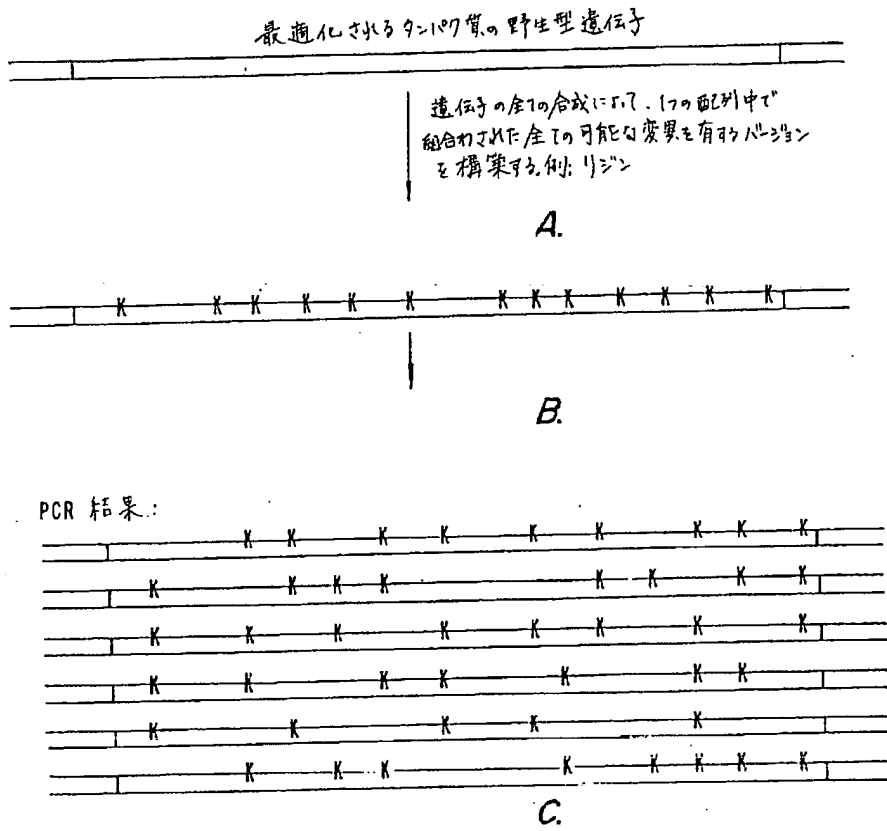
シャフトリニクに対する相同性



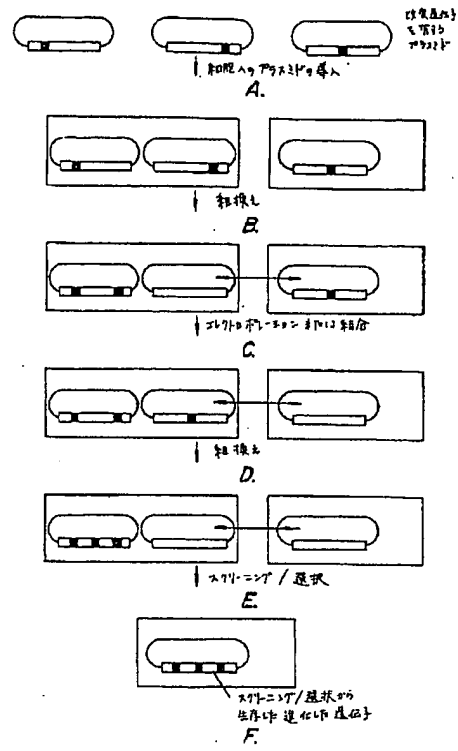
【図33】



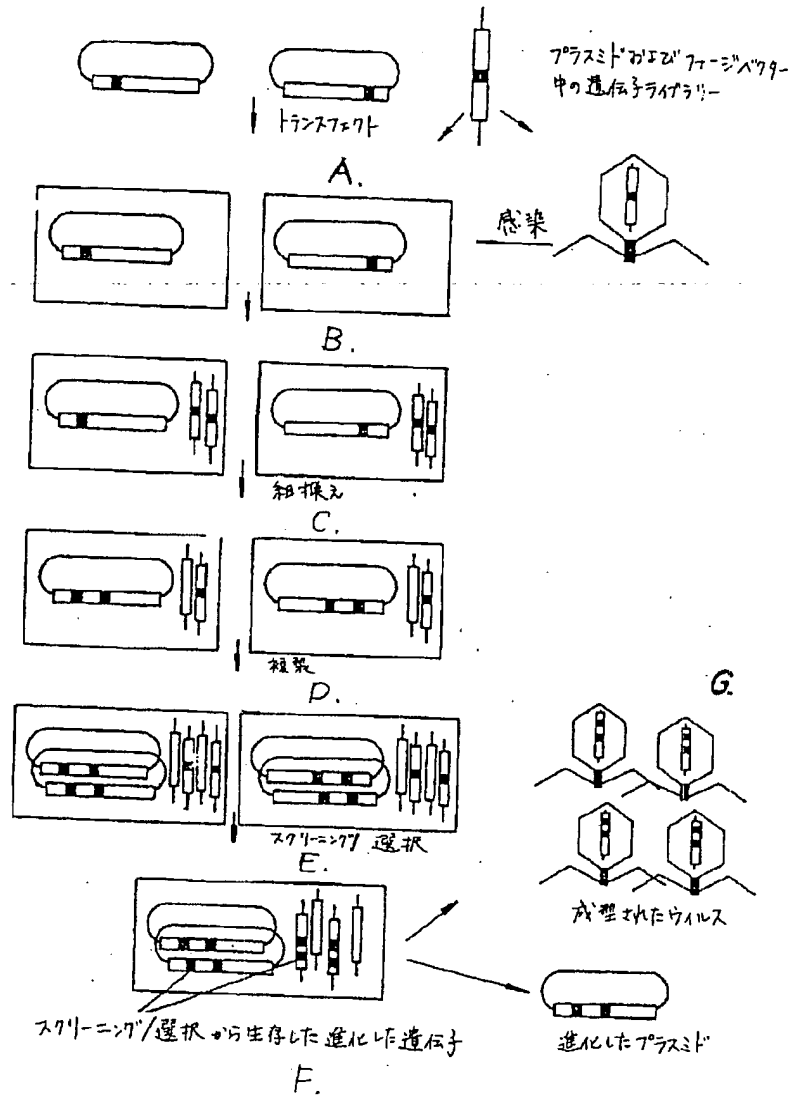
【図24】



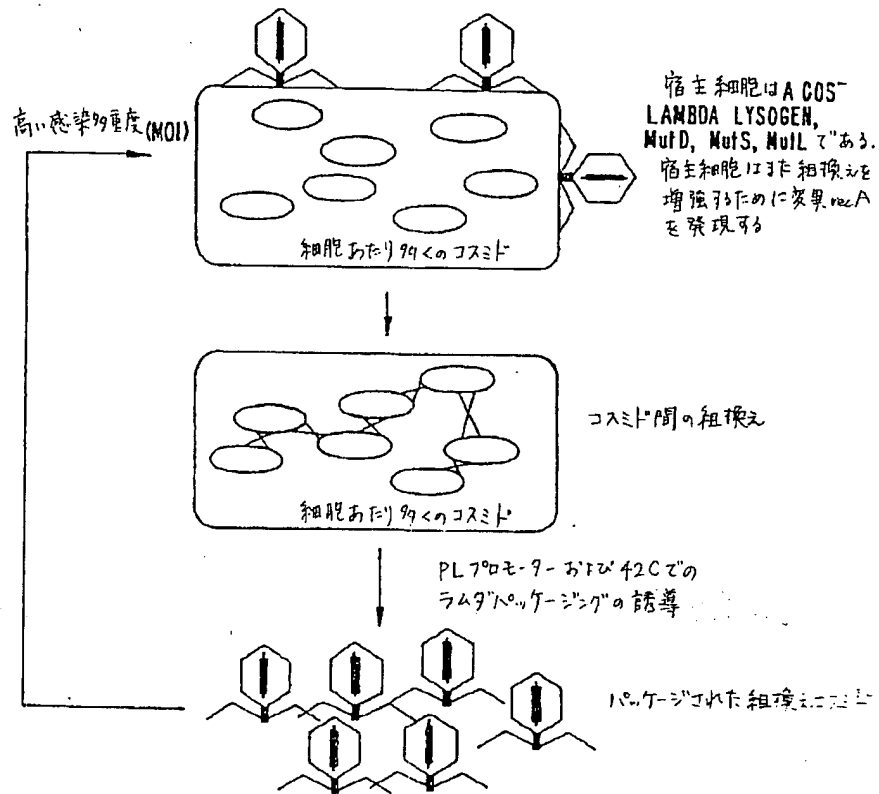
【図26】



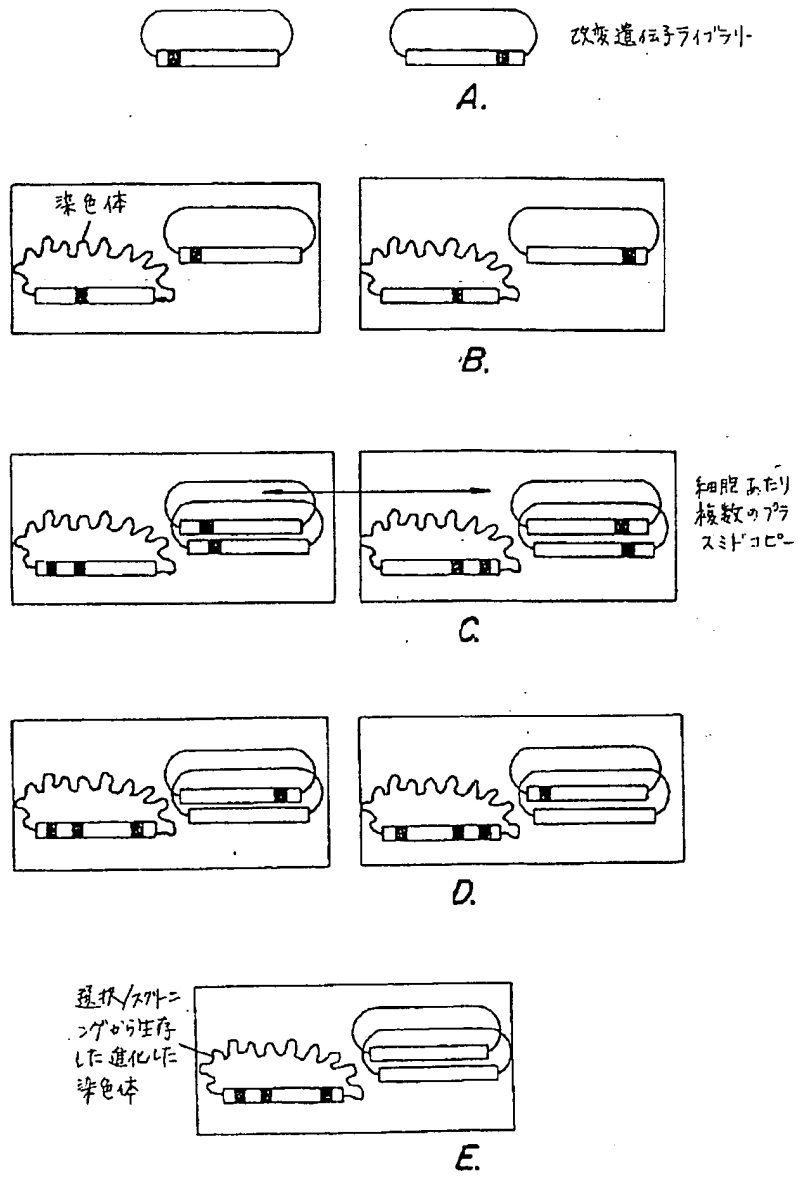
【図27】



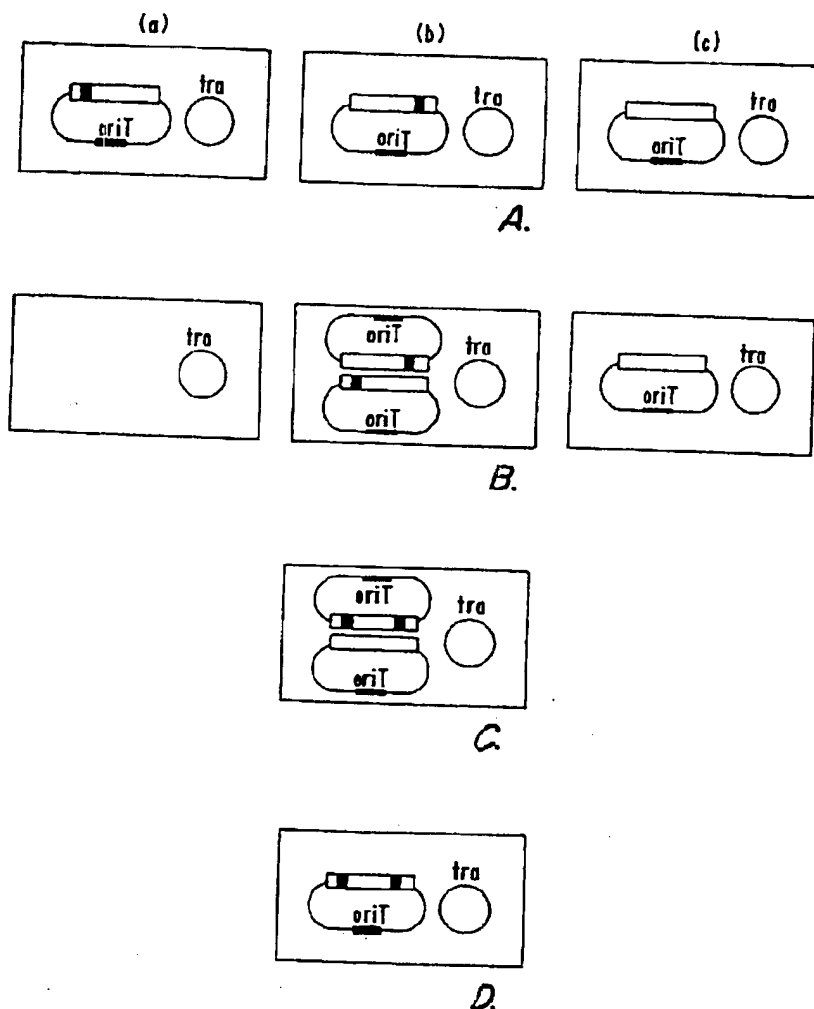
【図28】



【図29】



【図30】



【手続補正書】

【提出日】平成12年5月17日(2000.5.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリヌクレオチドをシャッフルする方法であって、以下：シャッフルされるべきポリヌクレオチドの複数の改変体を選択する工程であって、該ポリヌクレオチドは複数の遺伝子をコードする、工程；該ポリヌクレオチドの複数の選択された改変体からの配列を有す

る部分的にアニールされたポリヌクレオチド鎖においてマルチサイクリックポリヌクレオチド伸長プロセスを、1つの鎖が、別の鎖の伸長のためのテンプレートとして作用し、該1つの鎖が、該別の鎖と部分的にアニールして組換えポリヌクレオチドの集団を生成する条件下で行う工程であって、該ポリヌクレオチド鎖が互いに類似な領域および異種の領域を有し、そして該類似な領域を介して部分的にアニールされる、工程、
遺伝子またはその発現産物によって付与される所望の性質について、該複数の遺伝子をコードする組換えポリヌクレオチドをスクリーニングまたは選択する工程、
を包含する、方法。

【請求項2】 前記複数の遺伝子が、本質的に物理的に

クラスター化される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記複数の遺伝子がマルチ成分経路を形成する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記マルチ成分経路における前記遺伝子の発現産物が二次代謝物を産生する、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記二次代謝物が抗生物質である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記改変体が天然の改変体を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記改変体が誘導された改変体を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 前記天然に存在する改変体が、前記複数の遺伝子の対立遺伝子改変体を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項9】 前記天然に存在する改変体が、前記複数の遺伝子の種改変体を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項10】 前記増幅プロセスを行う前にポリヌクレオチドの改変体の集団をランダムにフラグメント化する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項11】 前記増幅プロセスの少なくとも1つのサイクルが、前記ポリヌクレオチドの改変体の不完全な伸長を生じる条件下で行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項12】 所望の特性を有する発現産物であって、該産物が、請求項1に記載の方法により得られる組

換えポリヌクレオチドによりコードされる、発現産物。

【請求項13】 前記得られる組換えポリヌクレオチドが、マルチ成分経路を形成する代謝酵素をコードする、請求項12に記載の発現産物。

【請求項14】 前記ポリヌクレオチドが、ヒ酸塩解毒経路またはカドミウム解毒経路をコードする、請求項12に記載の発現産物。

【請求項15】 所望の特性を有する発現産物を製造する方法であって、該産物は請求項1に記載の方法により得られる組換えポリヌクレオチドによりコードされる、発現産物を製造する方法。

【請求項16】 前記得られる組換えポリヌクレオチドが、マルチ成分経路を形成する代謝酵素をコードする、請求項12に記載の発現産物を製造する方法。

【請求項17】 前記ポリヌクレオチドが、ヒ酸塩解毒経路、またはカドミウム解毒経路をコードする、請求項13に記載の発現産物を製造する方法。

【請求項18】 前記組換えポリヌクレオチドによりコードされる産物が抗体である、請求項1～11に記載の方法。

【請求項19】 前記組換えポリヌクレオチドによりコードされる産物が抗体である、請求項12～14に記載の発現産物。

【請求項20】 前記組換えポリヌクレオチドによりコードされる産物が抗体である、請求項15～17に記載の方法。

フロントページの続き

(71)出願人 599133761

3410 Central Expressway,
Santa Clara, California 95051 U. S. A.

(72)発明者 アンドレアス クラメリ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94040,
マウンテン ビュー, ドルシラ ドライブ 531

THIS PAGE BLANK (USPTO)